

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2000-295987  
(P2000-295987A)

(43)公開日 平成12年10月24日(2000.10.24)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 1 2 N 15/02	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A D
A 6 1 K 35/30		A 6 1 K 35/30	
A 6 1 P 25/28		A 6 1 P 25/28	
43/00	1 0 7	43/00	1 0 7
C 1 2 N 5/10		C 1 2 Q 1/02	
審査請求 未請求 請求項の数14 O L 外国語出願 (全 97 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-48291(P2000-48291)

(22)出願日 平成12年1月20日(2000.1.20)

(31)優先権主張番号 2 3 4 3 3 2

(32)優先日 平成11年1月20日(1999.1.20)

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 500078967

セダーシナイ メディカル センター  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロス  
アンジェルス ベバリー プールバード  
8700番

(72)発明者 ミシェル エフ、レベスク

アメリカ合衆国 カリフォルニア、ビーバ  
リイ ヒルズ、エス、キャムデン ドライ  
ブ 457

(74)代理人 100066692

弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トランスフェクトされた上皮基底細胞の神経原細胞 (neural progenitor cell)

(57)【要約】 1(修正有)ニューロン細胞および/またはグリア細胞への分化転換

【課題】神経前駆細胞、ニューロン細胞、神経膠細胞に  
関連する特徴を有する培養細胞系を提供する。胎児性供  
給源を必要としない。【解決手段】NeuroD1、NeuroD2、ASH  
1、Zic1、Zic3およびMyT1などよりなる神  
経原性転写因子、その相同的cDNA断片を含むベク  
ターでトランスフェクションした表皮基底細胞を、ヒトM  
SX1遺伝子、ヒトヘS1遺伝子のセグメントを含んで  
なるアンチセンスオリゴヌクレオチドの存在下、場合  
によりニューロトロフィンやサイトカイン類の共存下に培  
養して分化誘導する。神経系関連障害の原因究明、遺伝  
子治療や細胞治療、化学治療剤の開発の為のスクリー  
ニング系に利用すること。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および／または免疫学的特徴を有する細胞に、分化転換する方法であって、

(a) 哺乳動物被験体の皮膚に由来する1つまたはそれ以上の表皮基底細胞を含む増殖表皮基底細胞集団を培養すること；

(b) *NeuroD1* (*NeuroD1*)、*NeuroD2* (*NeuroD2*)、*ASH1*、*Zic1*、*Zic3*、および*MyT1*よりなる群からの、ヒト神経原性転写因子または相同的な非ヒト神経原性転写因子、またはその活性な断片をコードする少なくとも1つのcDNAを含有する1つまたはそれ以上の真核生物発現ベクターにより、該表皮基底細胞をインビトロでトランスフェクションすることにより、該細胞中で少なくとも1つの神経原性転写因子が発現されるようにすること；

(c) ヒト*MSX1* 遺伝子および／またはヒト*HES1* 遺伝子の1つのセグメント、またはこれらのいずれかの相同的な非ヒト対応物を含んでなる、少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドの存在下で、トランスフェクションした細胞を増殖させ、こうしてニューロン分化の少なくとも1つの負の調節因子を抑制すること；および、場合により

(d) レチノイド、および*BDNF*、*CNTF*、*PDGF*、*NGF*、*NT-3*、*NT-4*、ソニックヘッジホッグ (*sonic hedgehog*)、およびこれらのいずれかの活性な断片よりなる群から選択される少なくとも1つのニューロトロフィン、または*IL-6*を含むサイトカインと一緒に該表皮細胞を増殖させ、こうして細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および／または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換することを含んでなる、上記方法。

【請求項2】 生理学および／または免疫学的特徴は、ネスチン (*nestin*)、神経RNA結合タンパク質ムサシ (*Musashi*)、ニューロフィラメントM、神経特異的β-チューブリン、神経特異的エノラーゼ、微小管結合タンパク質2、神経膠線維酸性タンパク質 (*GFAP*)、O4、またはこれらのいずれかの組合せよりなる群から選択されるマーカーの発現である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 形態学的特徴は、長さが少なくとも約50マイクロメートルの1つまたはそれ以上の形態学的な軸索突起様突起を含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 1つまたはそれ以上の神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の形態学的、生理学および／または免疫学的特徴を有する分化転換した細胞であって、  
神経原性転写因子*NeuroD1*、*NeuroD2*、*A*

*SH1*、*Zic1*、*Zic3*、または*MyT1*をコードするDNAに機能的に結合した構成性真核生物プロモーター配列を含んでなる1つまたはそれ以上の発現ベクターでトランスフェクションした表皮基底細胞であり、該神経原性転写因子をコードするDNAは、ヒト由来のDNAであるか、または相同的な非ヒト対応物であるか、またはこれらのいずれかをコードする遺伝子の活性な断片であり、該細胞は、ヒト*MSX1* 遺伝子またはヒト*HES1* 遺伝子のセグメント、または相同的なその非ヒト対応物を含んでなる少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理され、そして該細胞は、レチノイドと少なくとも1つのニューロトロフィンの存在下で増殖させ、こうして該表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および／または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換する該表皮基底細胞を含んでなる、上記細胞。

【請求項5】 生理学および／または免疫学的特徴は、ネスチン (*nestin*)、神経RNA結合タンパク質ムサシ (*Musashi*)、ニューロフィラメントM、神経特異的β-チューブリン、神経特異的エノラーゼ、微小管結合タンパク質2、神経膠線維酸性タンパク質 (*GFAP*)、O4、またはこれらのいずれかの組合せよりなる群から選択されるマーカーの発現である、請求項4に記載の分化転換した細胞。

【請求項6】 形態学的特徴は、長さが少なくとも約50マイクロメートルの1つまたはそれ以上の形態学的な軸索突起様突起を含んでなる、請求項4に記載の分化転換した細胞。

【請求項7】 細胞により発現される生理学および／または免疫学的特徴は、ネスチン (*nestin*)、神経RNA結合タンパク質ムサシ (*Musashi*)、ニューロフィラメントM、神経特異的β-チューブリン、神経特異的エノラーゼ、微小管結合タンパク質2、神経膠線維酸性タンパク質 (*GFAP*)、O4、またはこれらのいずれかの組合せよりなる群から選択されるマーカーである、請求項4に記載の分化転換した細胞。

【請求項8】 細胞により発現される形態学的特徴は、長さが少なくとも約50マイクロメートルの1つまたはそれ以上の形態学的な軸索突起様突起である、請求項4に記載の分化転換した細胞。

【請求項9】 神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および／または免疫学的特徴を発現する多数の細胞を含んでなる、請求項4に記載の分化転換した細胞に由来する細胞培養物。

【請求項10】 表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および／または免疫学的特徴を有する細胞に変換するキットであって、

(A) NeuroD1、NeuroD2、ASH1、Zic1、Zic3、およびMyT1よりなる群からの、神経原性転写因子、またはその断片、またはこれらのいずれかの相同的な非ヒト対応物をコードするcDNAを含有する1つまたはそれ以上の真核生物発現ベクター；

(B) ヒトMSX1遺伝子、ヒトHES1遺伝子、またはこれらのいずれかの相同的な非ヒト対応物に相当する少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチド；および

(C) レチノイドおよびBDNF、CNTF、PDGF、NGF、NT-3、NT-4、およびソニックヘッジホッグ (sonic hedgehog) よりなる群からの少なくとも1つのニューロトロフィンを含んでなる、上記キット。

【請求項11】 被験体の表皮基底細胞を分化転換する際の(A)、(B)、および(C)の使用説明書をさらに含んでなる、請求項10に記載のキット。

【請求項12】 新規な神経成長因子を単離するための、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する分化転換した表皮基底細胞の使用方法であって、

(a) 請求項1に記載のように表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換すること；

(b) 分化転換した細胞をインビトロで培養すること；

(c) 可能性ある神経成長因子にインビトロで培養細胞を暴露すること；および

(d) 細胞の生存、または該細胞の形態学的または電気生理学的特性および/または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある神経成長因子の作用の存在または非存在を検出し、それによって、細胞の生存、細胞における電気生理学的特性および/または分子生物学的性質を変化させる作用は、新規な神経成長因子の作用を示すことを含んでなる、上記方法。

【請求項13】 神経系障害を治療するための新しい薬物候補をスクリーニングするための、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する分化転換した表皮基底細胞の使用方法であって、

(a) 請求項1に記載のように、神経系障害の患者からの表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換すること；

(b) 分化転換した細胞をインビトロで培養すること；

(c) 新しい薬物候補にインビトロで培養細胞を暴露すること；および

(d) 細胞の生存、または該細胞の形態学的または電気

生理学的特性および/または分子生物学的性質に及ぼす、新しい薬物候補の作用の存在または非存在を検出し、それによって、細胞の生存、細胞における電気生理学的特性および/または分子生物学的性質を変化させる作用は、新しい薬物候補因子の作用を示すことを含んでなる、上記方法。

【請求項14】 1つまたはそれ以上の表皮基底細胞を含む増殖表皮基底細胞集団の培養は、無カルシウム培地を使用する角化細胞からの基底細胞の分離を含んでなる、請求項1に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

【0001】 (発明の背景) 本出願を通して種々の刊行物がカッコ内に参照される。これらの刊行物の開示内容は、本発明が関係する技術の現状をさらに十分に記載するために、その全体が参照により本出願に組み込まれる。

#### 【0002】

【産業上の利用分野】 本発明は、医療、特に神経組織再生の分野に関する。

#### 【0003】

【従来の技術】 ヒト神経系は、相互に特異的な連絡を作る非常に多様な型の細胞を含む。神経系は、末梢神経および中枢神経系を含む。中枢神経系は、脳、脳神経、および脊髄を含む。一旦損傷すると、成人の中枢神経系では、構造的自己修復の可能性が限定されている。成人では一般に新しいニューロン（身体の一部から別の部分への電気シグナルの伝達のために分化した興奮性細胞）を生成することが不可能であることが、典型的には神経組織の再生を妨げている。この限界は、例えば卒中または物理的外傷からの神経学的創傷、またはハンチントン病、アルツハイマー病、およびパーキンソン病のような変性疾患の治療法の開発を妨げてきた。パーキンソン病の胎児性組織移植の適度な成功は、細胞置換療法が神経学的創傷および変性の有用な治療法でありうることを示唆している。

【0004】 すなわち、細胞置換療法のアプローチにおいて、ニューロン細胞の直接転移を介する種々の神経学的外傷、疾患、障害、または疾病の治療において使用するためのニューロンの生成方法に対する、長年のニーズが存在する。

【0005】 一方、遺伝子治療は、他の型の神経系障害を治療するために必要とされる。脳は、脳内への大きな分子の流動を有効に阻止する血液脳関門により保護されているため、成長因子薬物、または他の治療薬候補の遺伝子産物の末梢への注射は無効である。すなわち、バイオテクノロジー工業が直面する大きな課題は、遺伝子治療産物を脳に直接送達するための効率的機構を発見することにより、分子レベルで神経学的障害を治療することである。この点に関して、ヒト神経細胞の再生可能な供給源は、脳および中枢神経系の残りの部分に遺伝子治療

産物を送達するための輸送手段となりうる。

【0006】最近まで、これらの有望な治療用のドナー物質の唯一の供給源は、胎児組織であった。しかし胎児組織の使用は、胎児組織の利用が限定されていること、レシピエントによるドナー物質の免疫拒絶の可能性、およびドナー物質による病気の感染のリスクを含む、大きな倫理的および技術的問題を投げかけている。

【0007】神経前駆細胞または神経幹細胞の培養により、ドナー物質の不足に取り組む幾つかの試みが行われてきた。例えば、ボス (Boss) らは、増殖したドナー細胞の成長、貯蔵、産生および移植に向けた神経前駆細胞の単離および増殖のための方法を教示した。(ボス (Boss) ら、「増殖したニューロン前駆細胞産物およびプロセス」、米国特許第5,411,883号)。アンダーソン (Anderson) らは、自己再生および神経細胞または神経膠細胞への分化が可能な、ドナー哺乳動物神経冠幹細胞の単離およびクローン性増殖のための方法を教示した。(アンダーソン (Anderson) ら、「哺乳動物神経冠幹細胞」、米国特許第5,589,376号)。ジョー (Johe) は、胚および成体哺乳動物ドナーの中枢神経系からの幹細胞の単離、増殖および指向性分化のための方法を教示した。(ジョー (Johe)、「哺乳動物の胚および成体中枢神経系からの幹細胞の単離、増殖および指向性分化」、米国特許第5,753,506号)。

【0008】神経前駆細胞は通常、胚体外胚葉組織から発生する。骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein) (BMP) は、外胚葉が、そのデフォルト状態の神経組織に発生するのを妨げ、かつ表皮組織の代わりにその発生を誘導するリプレッサーのファミリーである。(ワイ・タナベ (Y. Tanabe) とティー・エム・ジェッセル (T. M. Jessell)、「脊髄の発生における多様性とパターン」、*Science* 274:1115 [1996]；ワイ・ササイ (Y. Sasai)、「失われた環の同定：脊椎動物の胚におけるニューロン誘導と一次神経発生を結びつける遺伝子」、*Neuron* 21:455-58 [1998]；ワイ・フルタ (Y. Furuta) ら、「背側前脳発生の調節物質としての骨形成タンパク質 (BMPs)」、*Development* 124(11):2203-2212 [1997])。BMP2およびBMP4は、表皮分化を誘導する。(イー・ペラ (E. Pera) ら、「鳥類胚における外胚葉パターン化：表皮対神経板」、*Development* 126:63 [1999])。

【0009】BMPはまた、軟骨形成をも誘導する。ハタースリー (Hattersley) らは、マウス肢芽に由来する細胞株にBMP13を添加すると、軟骨芽細胞様細胞の形成が起こることを証明し、そして先天性または外傷誘導性損傷の部位に関節軟骨形成を誘導するた

めのBMP13の使用法、および軟骨を維持するためのBMP9の使用法を教示した。(ハタースリー (Hattersley) ら、「骨形成タンパク質による軟骨誘導」、米国特許第5,902,785号)。

【0010】BMPシグナル伝達は、表皮誘導およびニューロン分化の阻害に関係する前初期応答遺伝子である *msx1* により媒介されるようである。スズキ (Suzuki) らは、BMP RNAをアフリカツメガエル胚に注射したとき、彼らは *msx1* RNA産生を検出した；彼らが *msx1* RNAを注射したとき、胚は眼のようなニューロン構造を失った。(スズキ (Suzuki) ら、「アフリカツメガエル *msx1* はBMP4による表皮誘導および神経阻害を媒介する」、*Development* 124:3037 [1997])。解離性外胚葉細胞に *msx1* を直接加えると、表皮発生はアップレギュレーションされ、そして神経発生はダウンレギュレーションされた。ヒトでは同様に、BMP成長因子は、外胚葉細胞におけるホメオドメイン転写因子 *MSX1* の発現を誘導する。一旦 *MSX1* が発現されると、ニューロン決定遺伝子の誘導は同時に抑制され、ニューロン分化は阻害される。

【0011】BMPは、少なくとも2つの機作 (MASH1タンパク質の蛋白質分解と *Zic3* 産生の阻害) により神経発生をダウンレギュレーションするようである。神経前駆細胞のBMPへの暴露は、ショウジョウバエ (*Drosophila*) のアカエテースクート (Achaete-Scute) 複合体 (ASH1) に相同であり、かつ嗅覚受容体ニューロンの産生に必要な転写因子であるMASH1タンパク質の急速な消失を誘発した。(ショウ (Shou) ら、「BMPは、転写因子の分解を伴う機作により神経発生を阻害する」、*Nat. Neurosci.* 2:339 [1999])。BMPのインヒビターである優性の陰性型のBMP受容体の、アフリカツメガエル胚へのマイクロインジェクションは、神経発生を増大させるタンパク質である *Zic3* の産生を誘導した。(ナカタ (Nakata) ら、「神経および神経冠発生の両方における主たる調節物質であるアフリカツメガエル *Zic3*」、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:11980 [1997])。

【0012】BMPシグナル伝達活性のアンタゴニストは、ヒトの  $\alpha 2$ -HS糖タンパク質としても知られているフェチュイン (fetuin) 糖タンパク質、およびBMPアンタゴニストのDANファミリー (例えば、ノグギン (noggin)、コルディン (chordin)、フォリスタチン、およびグレムリン (gremlin)) を含む。(アール・メリノ (R. Merino) ら、「BMPアンタゴニストのグレムリン (Gremlin) は、発育肢における増生、軟骨形成およびプログラム細胞死を調節する」、*Development* 126(23):5515-22 [1999]；ディ



ー・セラードンネンフェルド (D. Sela-Donnenfeld) とシー・カルケイム (C. Kalcheim)、「背側神経管におけるBMP4とノグギン (noggin) の統合活性による神経冠遊走の発現の調節」、Development 126 (21): 4749-62 [1999]。例えば、デメトリオウ (Demetriou) らは、フェチュインが、ラット骨髄細胞の培養物において、BMPにより促進される機能である骨形成を阻止すること、およびフェチュイン由来ペプチドが、BMP2に結合することを証明した。(エム・デメトリオウ (M. Demetriou) ら、「フェチュイン/アルファ2-HS糖タンパク質はトランスホーミング増殖因子-ベータII型受容体ミミックおよびサイトカインアンタゴニストである」、J. Biol. Chem. 271: 12755-61 [1996])。胚発生および早期生後発育の間に、フェチュインは、網膜神経節細胞層、神経芽細胞層における細胞のサブ集団、および発育小脳の一部に存在することが証明された。

(キッチンナー (Kitchenner) ら、「ラットの胎児および生後発育中の網膜と小脳のニューロンにおけるフェチュイン」、Int. J. Dev. Neurosci. 17: 21 [1999])。

【0013】フェチュインは、無血清培地における添加物として使用されてきた。ハム (Ham) らは、筋肉変性疾患に罹患した患者の筋肉への移植を目的とする正常ヒト筋衛星細胞の増殖用の無血清培地における、添加物としてのフェチュインの使用を教示した。(ハム (Ham) ら、「正常ヒト筋衛星細胞用の培地」、米国特許第5, 143, 842号; ハム (Ham) ら、「正常ヒト筋衛星細胞用の培地」、米国特許第5, 324, 656号)。ベーカー (Baker) は、広範囲の細胞懸濁液および単層を増殖させることができる規定無血清培地における、添加物としてのフェチュインの使用を教示した。(ベーカー (Baker)、「無血清細胞培養培地およびこれらを調製するためのプロセス」、米国特許第4, 560, 655号)。

【0014】BMP以外の他の因子は、神経分化の調節に関与するようである。イシバシ (Ishibashi) らは、スプリット ホモログ-1のヘアリーおよびエンハンサー (Hairy and Enhancer of Split Homolog-1) (HES1) の永続的発現が、ニューロンおよび神経膠の分化を激しく混乱させることを証明した。彼らは、胚マウスの脳の側脳室を、HES1を産生するレトロウイルスで感染させた。これによって、感染させた発生細胞における遊走および分化は起きなかった。(イシバシ (Ishibashi) ら、「らせんループ-らせん (Helix-Loop-Helix) 因子HES-1の永続的発現は、中枢神経系における哺乳動物神経分化を妨げる」、The EMBO Journal 13: 179

9 [1994])。イシバシ (Ishibashi) らはまた、マウスのHES1遺伝子を破壊して、通常よりも早い神経発生を観察した。彼らは、HES1が、神経発生のタイミングを制御すると結論した。(イシバシ (Ishibashi) ら、「哺乳動物スプリット ホモログ-1のヘアリーおよびエンハンサー (Hairy and Enhancer of Split Homolog-1) (HES1) の標的化破壊は神経らせんループ-らせん因子のアップレギュレーション、早発の神経発生、および重篤な神経管の欠損をもたらす」、Genes & Development 9: 3136 [1995])。さらにレチノイン酸のようなレチノイドは、幾つかの神経細胞集団の分化を誘導する役割を担うことがある。(例えば、ワイ・レノンコート (Y. Renoncourt) ら、「ES細胞からインビトロで誘導したニューロンは、運動ニューロンおよび介在ニューロンに特有なホメオタンパク質を発現する」、Mechanisms of Development 79: 185-97 [1998])。

【0015】すなわち、ニューロン組織の分化は、多くの正および負の調節分子の相互作用を伴う。各細胞内の発生シグナルおよびその周囲の微環境に応じて、あらゆるニューロン集団は、特定のセットの神経マーカー、神経伝達物質、および受容体を発現する。神経前駆細胞は、微環境における生理学的シグナルに応じて他の型のニューロン細胞に分化するため、発現されるセットは異なってくる。(例えば、ディー・エル・ステンプル (D. L. Stemple) とエヌ・ケー・マハントッパ (N. K. Mahanthappa)、「神経幹細胞は噴射している」、Neuron 18: 1-4 [1997]; ワイ・レノンコート (Y. Renoncourt) ら、「ES細胞からインビトロで誘導したニューロンは、運動ニューロンおよび介在ニューロンに特有なホメオタンパク質を発現する」、Mechanisms of Development 79: 185-97 [1998]; エイ・ジェイ・カルヤニ (A. J. Kalyani) ら、「脊髄ニューロン前駆細胞は培養で多数のニューロン表現型を発生させる」、J. Neurosci. 18 (19): 7856-68 [1998])。各型のニューロン細胞は、形態(例えば、長い突起または軸索突起)、1セットの神経特異的マーカー(例えば、ニューロフィラメントM、神経特異的チューブリン、神経特異的エノラーゼ、微小管結合タンパク質2、など)の発現、神経伝達物質(例えば、ドーパミン、またはドーパミン合成における重要な酵素であるチロシンヒドロキシラーゼの発現)の合成、および膜興奮性を含む、幾つかの基準により特徴づけられる。

【0016】

【発明が解決しようとするとする課題】現代の神経生物学の中心的原则の1つは、分化後、全ての型のニューロ

ン細胞ではないとしても主要な投射ニューロンの各々は、それらの標的ニューロン細胞に到達するために、その生存に特異的なサイトカイン、すなわち神経栄養性または神経成長因子を必要とする。多くの疾患におけるニューロパシー (neuropathy) は、そのような神経成長因子により引き起こされるか、またはそれらの欠乏を伴う。これらの神経成長因子は、次世代の神経系障害の予防薬および治療薬である。これまで神経系において知られている成長因子の多くは、末梢神経に及ぼすこれらの作用により発見されたが、これらは、脳内に存在する成長因子の非常にマイナーな部分である可能性が高い。主として、特定の型のニューロン細胞は脳から単離し、かつ規定培養条件で維持するのが困難であるため、脳からの成長因子の検索は困難であった。

【0017】この限界のため、中枢神経系を指向した伝統的薬理学による薬物の発見は、全脳ホモジネートや動物を使用して行われた。これらの研究によって主に、広い作用と副作用を伴う神経伝達物質の類似体が生成された。しかし脳からより多くの神経伝達物質受容体とシグナル伝達タンパク質が同定されるにつれ、1つの神経伝達物質が1つの受容体を活性化するというドグマは、単純化しすぎであることが明らかになってきている。ニューロン中のほとんどの受容体複合体は、幾つかの遺伝子によりコードされるタンパク質サブユニットからなっており、各遺伝子は、多くの異なる変種タンパク質を合成する。これらの変種によって、広範な可能な受容体の組合せが生じるのであって、ある神経伝達物質と相互作用できる単一の受容体が生じるわけではない。その結果、ある範囲のシグナル出力が、単一の神経伝達物質の作用により産生される。そして神経伝達物質によるニューロンに及ぼす特異的シグナルは、どの受容体複合体がその細胞により産生されるかに依存する。すなわち、細胞の多様性は、分子の多様性に一致し、かつ脳機能の複雑さの基になる主要構造要素を構成し、そして薬物スクリーニング目的で培養することができる種々の型のニューロン細胞の供給源が必要とされる。

【0018】

【課題を解決するための手段】従って、神経学的研究および応用神経生物学の分野には、研究、細胞治療、または遺伝子治療において使用するための、神経前駆細胞、およびニューロン細胞または神経膠型細胞に特異的に関連する特徴を有する細胞の再生可能な非胎児性供給源に対するニーズが残っている。重要なことに、そのような細胞の使用によって、神経系細胞の脳内移植による神経学的機能の回復を目的とする治療的アプローチにおいて、ヒト胎児組織に対するニーズを排除することができた。本発明のこれらおよび他の利点を、以下に記述する。

【0019】(発明の要約) 本発明は、表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞

の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学的および/または免疫学的特徴を有する細胞に、分化転換する方法に関する。本方法は、哺乳動物被験体の皮膚に由来する1つまたはそれ以上の表皮基底細胞を含む増殖表皮基底細胞集団の培養を伴う。これらの表皮基底細胞は、ヒト神経原性転写因子、または相同的な非ヒト対応物、またはその活性断片 (例えば、NeuroD1、NeuroD2、ASH1、Zic1、Zic3、またはMyT1) をコードする少なくとも1つのcDNAを含有する1つまたはそれ以上の真核生物発現ベクターで、インビトロでトランスフェクションすることにより、少なくとも1つの神経原性転写因子が、細胞内で発現されるようにする。トランスフェクションした細胞は、ヒトMSX1遺伝子および/またはヒトHES1遺伝子のセグメント、またはこれらのいずれかの相同的な非ヒト対応物を含んでなる少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドが存在するインビトロ増殖培地中で増殖させ、こうして少なくとも1つのニューロン分化の負の調節物質を抑制し;そして細胞は、場合によりレチノイドおよび少なくとも1つのニューロトロフィン (例えば、BDNF、CNTF、PDGF、NGF、NT-3、NT-4、またはソニックヘッジホッグ (sonic hedgehog))、またはIL-6を含むサイトカインと一緒にさらに増殖させる。本発明の方法により、細胞は、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学的および/または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換する。

【0020】本発明はまた、表皮起源の分化転換した細胞に関する。本発明の分化転換した細胞は、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学的および/または免疫学的特徴を示す表皮基底細胞起源の細胞である。生理学的および/または免疫学的特徴は、特に問わないが、それによって分化転換した細胞が、神経前駆細胞、ニューロン細胞もしくはニューロン様細胞、または神経膠細胞もしくは神経膠様細胞として認識される、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞に特異的な1つまたはそれ以上のマーカーの発現であってよい。

【0021】本発明はまた、本発明の分化転換した細胞に由来する細胞培養物に関する。

【0022】本発明はまた、その分化転換の前または後に、前もって選択された分泌性調節因子またはその生化学的前駆体をコードするDNA、またはこれらのいずれかの合成を触媒する酵素をコードするDNAを含んでなる発現ベクターにより遺伝子的に修飾された、本発明の分化転換した細胞を使用して局所的に分泌性調節因子を送達する方法に関する。遺伝子的に修飾した、分化転換した細胞は、哺乳動物被験体中に移植され、そして移植細胞は、局所的に分泌性調節因子を分泌する。

【0023】本発明はまた、新規な神経成長因子または

可能性ある化学療法剤を同定するために本発明の分化転換細胞を使用する方法に関する。本方法は、増殖表皮基底細胞の集団を、ニューロン前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞に、分化転換すること；分化転換した細胞を培養すること；可能性ある神経成長因子（すなわち、ニューロトロフィンまたは神経栄養因子）および／または可能性ある化学療法剤に培養細胞をインビトロで暴露すること；および細胞の生存または細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある神経成長因子および／または可能性ある化学療法剤の作用の存在または非存在を検出することを伴う。細胞の生存、細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質を変化させる作用が存在することは、可能性ある神経成長因子および／または可能性ある化学療法剤の活性を示す。

【0024】本発明はまた、遺伝子起源の神経系障害を治療するための可能性ある化学療法剤をスクリーニングするために、本発明の分化転換した細胞を使用する方法に関する。本方法では表皮基底細胞は、遺伝子起源の特定の神経系障害を有するヒト被験体に由来する。この細胞は、本発明の方法により分化転換される。分化転換した細胞は、培養し、インビトロで可能性ある化学療法剤に暴露する。本方法は、細胞の生存または該細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある化学療法剤の作用の存在または非存在を検出することを伴う。細胞の生存、細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質を変化させる作用は、化学療法剤の活性を示す。

【0025】本発明はまた、表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学的および／または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換するためのキットに関する。このキットは、本発明の方法を実施するのに有用である。

【0026】本発明は、表皮細胞を、応用神経生物学の分野において多くの用途を有する異なる型の神経細胞に、変換または分化転換する方法に関する。詳細には、新しく創り出した本発明のニューロンは、神経学的障害および疾患を緩和することを目的とした細胞治療および遺伝子治療の両方において使用することができる。さらに、本発明は、種々の医療および研究応用において使用されるニューロンの再生可能な供給源としてのヒト胎児組織の必要性をなくする。

【0027】

【発明の効果】本発明のこれらの利点や他の利点および特徴は、以下の好適な実施態様の詳細な説明において充分に記述される。

【0028】（本発明の好ましい態様の詳細な説明）ニューロン細胞または遺伝子治療のアプローチに現在関連

している困難さが認識され、これが、ニューロン細胞、特に自家移植に使用される細胞の代替供給源の使用に係しているため、これが本発明を導いた。本発明は、表皮細胞を、大脳内移植に使用することができる異なる型のニューロン細胞に変換または分化転換する方法を提供する。重要なことに、本発明はまた、新しく創り出したニューロンの遺伝子操作を可能にする。

【0029】本発明の重要な側面は、これが、インビトロ増殖および分化転換後に移植することができる異なる型のニューロン細胞を発生させるために、患者自身の細胞の使用を可能にすることである。すなわち、この技術により、非宿主細胞の移植に伴う問題（例えば、免疫拒絶および感染性疾患のリスク）が排除される。

【0030】本発明を使用して個々の患者からニューロンを生成し、こうして神経外傷、卒中、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病）を含む多くの神経学的症状のための治療様式として自家移植を可能にする。すなわち、本発明は、目的の疾患または外傷を治療するための神経学的治療を提供する。

【0031】要約すると、この技術は、1）宿主ニューロンの消失を補償するため、または2）遺伝子に基づく薬物を送達するための輸送手段として、ニューロンの移植を必要とする臨床的治療のためのニューロンの豊富な供給源を提供する。さらに、本発明は、基礎研究および薬物スクリーニングにおいて使用するための新規な神経学的手段を提供する。

【0032】本発明の分子的な理論的基礎は、後成シグナル伝達および特異的転写因子系の活性化を含む、多くの分子プロセスのニューロン発生における組織化された作用を利用する。発生の間、外胚葉細胞は、周囲細胞から受けるシグナルに応じてニューロン組織または表皮に発展する。この早期発生段階で、成長因子の骨形成タンパク質ファミリー（BMP）の種々のメンバーの活性化によって表皮分化が生じ、一方これらの作用の遮断によってニューロン分化が生じる。（総説としてタナベ（Tanabe）とジェッセル（Jessel）、1996を参照のこと）。この分化経路は、外胚葉細胞内のホメオドメイン転写因子MSX1の発現を誘導するBMP成長因子の作用に基づく。一旦MSX1が発現されると、ニューロン決定遺伝子の誘導は同時に抑制され、ニューロン分化は阻害される。（スズキ（Suzuki）ら、1997）。

【0033】あるいは、レチノイン酸とソニックヘッジホッグ（Sonic Hedgehog）（Shh）シグナル伝達は、その活性がニューロン分化に必須である幾つかのニューロン決定遺伝子および分化遺伝子の発現の誘導を担当する。（総説についてはタナベ（Tanabe）とジェッセル（Jessel）、1996を参照のこと）。詳細には、データは、幾つかの神経原性塩基

性らせんループらせん (Helix-Loop-Helix) (bHLH) およびジンクフィンガー転写因子の過剰発現によって、非決定外胚葉からニューロン組織への変換が生じることを証明している。さらには、bHLH転写因子、NeuroD1、NeuroD2 (リー、ジェイ・イー (Lee, J. E.)、ホレンバーク、エス・エム (Hollenberg, S. M.)、スナイダー、エル (Snider, L.)、ターナー、ディー・エル (Turner, D. L.)、リップニック、エヌ (Lipnick, N.) およびヴァイントラウプ、エイチ (Weintraub, H.)、(1995)、「NeuroD、塩基性らせんループらせんタンパク質によるアフリカツメガエル外胚葉からニューロンへの変換」、Science 268, 836-844; マコーミック、エム・ビー (McCormick, M. B.)、タミミ、アール・エム (Tamimi, R. M.)、スナイダー、エル (Snider, L.)、アサクラ、エイ (Asakura, A.)、バーグストロム、ディー (Bergstrom, D.) およびタップスコット、エス・ジェイ (Tapscott, S. J.)、(1996)、「NeuroD2 および NeuroD3: NeuroD 遺伝子ファミリー内の独特な発現パターンおよび転写活性化ポテンシャル」、Mol. Cell. Biol. 16, 5792-5800)、またはニューロゲニン1 (neurogenin 1) (マー、キュー (Ma, Q.)、キントナー、シー (Kintner, C.) およびアンダーソン、ディー・ジェイ (Anderson, D. J.)、(1996)、「ニューロゲニン、脊椎動物ニューロン決定遺伝子の同定」、Cell 87, 43-52; マコーミック (McCormick) ら、(1996)、またはジンクフィンガー転写因子 MyT1 (ベレフロイド、イー・ジェイ (Bellefroid, E. J.)、ブルゴーニャン、シー (Bourguignon, C.)、ホルマン、ティー (Holleman, T.)、マー、キュー (Ma, Q.)、アンダーソン、ディー・ジェイ (Anderson, D. J.)、キントナー、シー (Kintner, C.) およびピーラー、ティー (Pieler, T.)、1996、「ニューロン分化における調節機能を有する X-MyT1、アフリカツメガエル C2HC 型ジンクフィンガータンパク質」、Cell 87, 1191-1202) または Zic3 (ナカタ (Nakata) ら、1997) の強制発現によって、追加の神経原性転写因子の誘導および両生類外胚葉細胞のニューロン分化の開始が起きる。

【0034】さらには、遺伝子調節のレベルで、神経原性 bHLH 転写因子の作用は、転写を抑制することが知られている HES ファミリーの転写因子により拮抗される。発生ニューロン細胞での HES1 タンパク質の過剰発現は、ニューロン分化を阻止し (イシバシ (Ishi

bashi) ら、1994)、一方その発現を阻止すると、ニューロン分化が刺激される (イシバシ (Ishibashi) ら、1995)。すなわち、ニューロン分化は、他の生物学的プロセスと同様に、正および負の因子の両方により調節される。

【0035】両生類の発生の間に機能することが知られている分子調節機作を、本発明の理論的基礎として利用した。本発明の方法および細胞産物は、ヒトニューロン分化の負の調節物質の抑制と協調して行われる、ヒトニューロン分化を正に調節する転写因子の誘導発現が、表皮細胞から新しく創り出したニューロンへの変換を生じさせるという発見に基づく。

【0036】これらの分子的機作を利用する本発明の方法によって、表皮基底細胞は、神経前駆細胞、ニューロン細胞または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換する。形態学的特徴は、例えば、長さが少なくとも約50マイクロメートルの1つまたはそれ以上のニューロン細胞を特徴づける軸索突起様突起を含む。生理学および/または免疫学的特徴は、1つまたはそれ以上の特異的マーカーの発現および/または神経成長因子および他のサイトカインに対する独特の生理学的応答を含む。細胞の、または詳細には細胞膜の電気化学的特性もまた、種々の型のニューロン細胞に特有のドーパミンまたはγ-アミノ酪酸 (GABA) のような調節因子の、分化転換した細胞による産生および分泌と同様に、生理学的特徴に含まれる。

【0037】本発明の方法により、増殖表皮基底細胞集団が培養される。すなわち、表皮基底細胞を、新しく創り出した神経前駆細胞、ニューロン、および神経膠細胞に、分化転換または変換する方法は、哺乳動物の被験体 (例えば、ヒト患者) の皮膚から表皮細胞を入手するところから始まる。増殖表皮基底細胞集団の細胞は、ヒト被験体を含む任意の哺乳動物被験体から得られる。細胞は、被験体の皮膚生検のような外科的治療から生じる組織試料から直接得られるか、または被験体の培養または貯蔵表皮基底細胞から間接的に得ることができる。

【0038】皮膚組織試料中のまたは基底表皮細胞と角化非基底表皮細胞との培養混合集団中の表皮基底細胞は、好ましくは混合細胞集団を無カルシウム増殖培地に暴露することにより、最終分化した角化表皮細胞から分離される。本発明の目的には、無カルシウム培地は、 $10^{-6}$ M 未満のカルシウムカチオン ( $Ca^{2+}$ ) を含有する。低いカルシウムカチオン濃度によって、基底細胞からケラチン形成性上部表皮層の剥離が起こる。(例えば、ピー・ケー・ジェンセン (P. K. Jensen) とエル・ボーランド (L. Bolund)、「ヒト表皮培養物における分化細胞層の低  $Ca^{2+}$  剥離: 表皮再生のインビトロモデル」、Experimental Cell Research 175: 63-73、[19

88] )。次に基底細胞は、吸引またはデカンテーションのような任意の便利な方法により角化細胞から物理的に分離、選択または単離される。カルシウムカチオンは、基底細胞から角化細胞（皮膚細胞）の発生を支持するために必要とされ、増殖培地にカルシウムを戻すと、脱分化細胞集団中に急速な基底細胞増殖が起こり（ジェンセン（Jensen）とボーランド（Bolund）[1988] ）、従って増殖表皮基底細胞集団が培養される。分化した角化細胞から分離、単離、または選択した後の個々の表皮基底細胞に関して、これ以上脱分化工程を行うことは必要ではない。

【0039】しかし表皮基底細胞以外の増殖型細胞では、脱調節される任意の特定の発生経路の発生を支持するのにカルシウムは必要とされない。脱分化の所望の目的を達成するための他の手段は、特異的な成長因子またはサイトカインによる細胞の処理を伴う。また、増殖培地中のカルシウムを排除する代わりに、遺伝子操作による表皮細胞の分化を担当する特異的な遺伝子発現経路を変更してもよい。さらに、増殖表皮基底細胞以外の細胞を使用するならば、カルシウムの排除は必要ではない。

【0040】次に表皮基底細胞のトランスフェクションまたはそれ以外の遺伝子修飾が、神経分化を担当する神経原性転写因子をコードする少なくとも1つのcDNAを含有する1つまたはそれ以上の発現ベクターを用いて、インビトロで行われる。適切なcDNAは、NeuroD1、NeuroD2、ASH1のような塩基性らせんループ-らせんアクチベーター、およびZic3のようなジンクフィンガー型アクチベーター、およびMyT1、またはbHLHおよび/またはZn-フィンガー神経原性遺伝子を含む他のcDNAを含む。転写因子は、好ましくはヒト起源のものであるが、本発明では相同的な非ヒト対応物を利用することもできる。NeuroD1、NeuroD2、ASH1、Zic1、Zic3、およびMyT1のこのような非ヒト対応物の配列は、例えば、NCBIのジーンバンク（GenBank）データベースから利用可能である（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）。神経原性転写因子遺伝子は、発現ベクターのプロモーターに機能的に結合して（すなわち、転写ユニットは、遺伝子が転写されるものから形成され）、遺伝子送達後、そこから遺伝子産物が細胞中で翻訳されるmRNAを産生する。従って本発明の方法により、神経原性転写因子の発現は、好ましくはサイトメガロウイルス（CMV）プロモーターのような構成性に発現される真核生物プロモーターにより制御される。

【0041】細胞への遺伝子送達は、任意の適切なインビトロ遺伝子送達方法による。（例えば、ディー・ティエー・カリエル（D. T. Curriel）ら、米国特許第5,521,291号および5,547,932号）。典型的には、遺伝子送達は、例えば、有効量の脂質トラ

ンスフェクション剤（リポフェクション（lipofection））と混合した適切なベクターと一緒にし、前もって選択した遺伝子材料を含む遺伝子送達混合物への細胞の暴露を伴う。この混合物の各成分の量は、細胞の特異的な種への遺伝子送達が最適になるように選択される。このような最適化は、日常的な実験を要するだけである。脂質に対するDNAの比は、幅広く、好ましくは約1:1であるが、使用される脂質物質とDNAの型に応じて他の割合を利用してもよい。この割合は、決定的に重要ではない。他の周知の遺伝子送達方法は、電気穿孔法または化学的方法を含む。（例えば、エム・オストレッシュ（M. Ostresh）、「入るに障壁なし：トランスフェクションの道具は戸口に生体分子を得る」、The Scientist 13（11）: 21-23 [1999]）。

【0042】本明細書において使用される「遺伝子送達物質」は、外来DNAセグメントの哺乳動物細胞中への摂取を増強するために遺伝子材料に添加される組成物を意味する。この増強は、遺伝子送達物質の非存在下の摂取に比較して測定される。遺伝子送達物質の例は、アデノウイルス-トランスフェリン-ポリリジン-DNA複合体を含む。これらの複合体は一般に、細胞中へのDNAの摂取を増大させ、そして細胞質を通る細胞の核へのその運搬の間の分解を減少させる。

【0043】免疫リポソームトランスフェクション法は、遺伝子送達の好ましい手段である。Ca-共沈、またはリポフェクタミン（Lipofectamine）（ライフ・テクノロジーズ（Life Technologies））、またはフュージーナー6（Fugene-6）（ベーリンガー・マンハイム社（Boehringer Mannheim, Inc.））のような遺伝子送達物質を使用するトランスフェクションのような、他の好適な方法でもまた、高いトランスフェクション効率を得られる。他の好ましい遺伝子送達物質は、リポフェクチン（Lipofectin）（登録商標）、DMRIE C、セルフェクチン（Cellfectin）（登録商標）（ライフ・テクノロジーズ（Life Technologies））、リポタクシー（LipoTAXI）（ストラタジーン（Stratagene））、スーパーフェクト（Superfect）またはエフェクテン（Effectene）（キアジェン（Qiagen））を含む。これらはウイルス物質ほど効率的な遺伝子送達物質ではないが、ウイルス由来遺伝子送達物質に普通は伴うサイズの制限なしに、脊椎動物ゲノムへの異種DNA配列の安定な組み込みを促進するという利点を有する。しかし、ウイルスまたはそのトランスフェクション性断片は、細胞への遺伝子材料の送達を促進するために使用することができる。適切なウイルスの例は、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスのようなレトロウイルス、マウスモロ

ニー白血ウイルスのような他のレンチウイルス、および水疱性口内炎ウイルス-糖タンパク質 (VSV-G) -マウスモロニー白血ウイルスと呼ばれるモロニーウイルスに由来するレトロウイルスベクター、おたふくかぜウイルス、およびこれらの任意のウイルスのトランスフェクション性断片、および細胞の細胞質による目的DNAセグメントの摂取 (および細胞質への放出) を促進する他のウイルス性DNAセグメント、およびこれらの混合物を含む。全ての上記ウイルスは、これらを非病原性または低抗原性にするのに修飾を必要とする。他の既知のウイルス性ベクターシステムもまた有用である。

【0044】トランスフェクション工程の次に、少なくとも1つの神経原性転写因子を発現、または過剰発現させ、それと同時にまたはほぼ同時に、ニューロン分化の抑制を担当する因子を不活化させる。この最後の工程は、増殖培地へのニューロン分化を抑制することが知られている少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチド (例えば、ヒトMSX1遺伝子および/またはヒトHES1遺伝子 (または相同的な非ヒト対応物)) の添加、および細胞の増殖により達成される。

【0045】すなわち、トランスフェクションした表皮基底細胞は、ヒトMSX1遺伝子のセグメントのヌクレオチド配列および/またはヒトHES1遺伝子のセグメントのヌクレオチド配列、またはこれらのいずれかの相同的な非ヒト対応物を、MSX1またはHES1の機能性遺伝子産物の発現を抑制するのに充分な量で含んでなる、少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドの存在下で増殖させる。MSX1とHES1両方の転写の抑制に向けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの充分な量は、培地中それぞれ約5~10  $\mu$ Mの濃度である。有用なアンチセンスオリゴヌクレオチド配列の例は、以下のヒトMSX1アンチセンスオリゴヌクレオチド配列:

5' -GACACCGAGTGGCAAAGAAGTCATGTC-3' (第1メチオニン) (MSX1-1; 配列番号: 13) または

5' -CGGCTTCCTGTGGTCGGCCATGAG-3' (第3メチオニン) (MSX1-2; 配列番号: 14); およびヒトHES1読み取り枠5' 配列: 5' -ACCGGGGACGAGGAATTTTCTCCATTATATCAGC-3' (HES-1; 配列番号: 15) またはHES1読み取り枠中央配列2:

5' -CACGGAGGTGCCGCTGTTGCTGGCTGGTGTGGTGTAGAC-3' (HES1-2; 配列番号: 16) に対応する2つのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。他のオリゴヌクレオチド配列もまた、これらが、ヒトまたは相同的な非ヒトMSX1遺伝子 (例えば、ジーンバンク (GenBank) 受け入れ番号M97676 [ヒト]; NM 002448 [ヒト]; X62097 [ニワトリ]; D8257

7.1 [アンビストマ・メキシカナム (Ambystoma mexicanum)]) またはHES1遺伝子の少なくとも1つのセグメント (例えば、ジーンバンク (GenBank) 受け入れ番号Y07572 [ヒト]; Q04666 [ラット]; P35428 [マウス]; AB019516 [イモリ]; AB016222 [サッカロミセス・ポンベ (Saccharomyces pombe)]; U03914 [サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)]) を含んでなる核酸にハイブリダイズする限り有用であり、MSX1またはHES1核酸を標的化 (すなわち、ハイブリダイズ) することにより機能性MSX1および/またはHES1遺伝子産物の発現を妨げる。当業者であれば、コンピュータ化アルゴリズム (例えば、パワーブラスト (PowerBLAST)、キューブラスト (QBLAST)、PSI-ブラスト (BLAST)、PHI-ブラスト (BLAST)、ギャップ化または非ギャップ化ブラスト (BLAST)、またはベイラー医科大学 (Baylor College of Medicine) サーバーを通じての「アライン (Align)」プログラム) を使用して、ゲノムデータベース (例えば、国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) のジーンバンク (GenBank) データベース) の配列類似性検索を行うことにより、他の有用なMSX1および/またはHES1オリゴヌクレオチド配列を容易に見出すことができる。 (例えば、アルチュール、エス・エフ (Altchul, S. F.)) ら、「ギャップ化ブラスト (BLAST) およびPSI-ブラスト (BLAST): 新世代のタンパク質データベース検索プログラム」、Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-402 [1997]; チャン、ジェイ (Zhang, J.) とマッデン、ティー・エル (Madden, T. L. )、「パワーブラスト (PowerBLAST): 相互または自動配列解析および注釈のための新しいネットワークブラスト (BLAST) アプリケーション」、Genome Res. 7 (6): 649-56 [1997]; マッデン、ティー・エル (Madden, T. L. ) ら、「ネットワークブラスト (BLAST) サーバーのアプリケーション」、Methods Enzymol. 266: 131-41 [1996]; アルチュール、エス・エフ (Altchul, S. F. ) ら、「基本的なローカルアラインメント検索ツール」、J. Mol. Biol. 215 (3): 403-10 [1990]) 。

【0046】好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの1つまたはそれ以上のヌクレオチド残基は、実施者により、または市販用または他の供給業者により使用される既知の合成方法によりチオ修飾され、培地中およ



び細胞中のオリゴヌクレオチドの安定性を増大させる。  
 (例えば、エル・ベロン (L. Bellon) ら、  
 「4' -チオ-オリゴペーター-D-リボヌクレオチ  
 ド: ペーター-4' -チオ-オリゴウリジレート合成、  
 ヌクレアーゼ抵抗性、塩基対形成性、およびHIV-1  
 逆転写酵素との相互作用」、Nucleic Acid  
 s Res. 21 (7): 1587-93 [199  
 3]; シー・レイディアー (C. Leydier) ら、  
 「4' -チオ-RNA: 混合塩基4' -チオ-オリゴ  
 リボヌクレオチド合成、ヌクレアーゼ抵抗性、および相  
 補的1本鎖および2本鎖との塩基対形成性」、Anti  
 sense Res. Dev. 5 (3): 167-74  
 [1995])。

【0047】トランスフェクションした細胞の増殖中  
 に、アンチセンスオリゴヌクレオチドへの暴露は、増殖  
 細胞中にあらかじめ存在するMSX1および/またはH  
 ES1タンパク質を分解するのに十分な時間である。比  
 較的短い半減期の特定のタンパク質では、必要な暴露時  
 間はわずか数時間から1日である。比較的長い半減期の  
 タンパク質は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる  
 長い処理を必要とする。一般には約2~3日間の暴露時  
 間で足りる。分化転換した細胞の発生のさらに別の過程  
 は、インビトロであろうとインビボで移植されようと、  
 これらが暴露されるインサイチュ (in situ)  
 環境の合図に依存する。場合により、分化転換した細胞  
 は、レチノイン酸またはビタミンAのようなレチノイド  
 化合物、および場合により脳由来神経栄養因子 (BDN  
 F)、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、血小板由来成  
 長因子 (PDGF)、神経成長因子 (NGF)、ニュー  
 ロトロフィン (NT) -3、ニューロトロフィン (N  
 T) -4、またはソニックヘッジホッグ (sonic  
 hedgehog) (Shh) のような神経成長因子ま  
 たはニューロトロフィン、および/またはこれらの任意  
 の機能性断片を含む培地中で増殖させる。例えば、全-  
 transレチノイン酸とBDNFにより新しく形成さ  
 れたニューロン細胞を処理すると、GABA作動性ニュー  
 ロンまたはニューロン様細胞 (ニューロフィラメント  
 Mを発現する) の発生が起こり、一方神経膠細胞-調整  
 培地とソニックヘッジホッグ (sonic hedge  
 hog) アミノ末端ペプチド (Shh-N) により処理  
 すると、主としてドーパミン作動性のニューロン細胞の  
 発生が起こる。Shh-Nによる処理は、ネスティン  
 (nestin) -免疫反応性細胞 (未定の神経前駆細胞  
 ) からのニューロンおよび乏突起神経膠細胞種の分化  
 を促進し、BMP2の抗増殖性、星状膠細胞誘導性、乏  
 突起神経膠細胞-抑制作用を阻害する。(例えば、ジ  
 ・チュー (G. Zhu) ら、「ソニックヘッジホッグ  
 (sonic hedgehog) とBMP2は、胚性  
 神経前駆細胞の増殖および分化に反対の作用を発揮す  
 る」、Dev. Biol. 21591: 118-29

[1999])。環境の合図に応じるこの適応性によ  
 り、細胞は哺乳動物被験体に移植すると、アンチセンス  
 オリゴヌクレオチドのさらなる添加なしに、インビトロ  
 またはインサイチュのニューロン分化を維持できる。

【0048】本方法により、任意の神経前駆細胞特異  
 的、神経細胞特異的、および/または神経膠細胞特異的  
 マーカーの発現は、従来の生化学的または免疫化学的手  
 段により検出される。好ましくは、特に限定されない  
 が、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、免疫蛍光  
 測定法 (IFA)、免疫電気泳動、免疫クロマトグラフ  
 イー測定法または免疫組織化学的染色法のような、免疫  
 化学的手段が使用される。これらの方法では、任意の種  
 々の神経前駆細胞、ニューロン細胞または神経膠細胞抗  
 原に選択的に結合する、マーカー特異的ポリクローナル  
 またはモノクローナル抗体または抗体断片、例えばFab  
 b、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、またはF(v)断片を  
 使用する。個々の特異的マーカーを標的とする抗体は、  
 市販されており、かつ抗体製造業者により推奨されるよ  
 うに便利に使用される。神経前駆細胞、ニューロン細  
 胞、または神経膠細胞に特異的なマーカーは、例えば、  
 ネスティン (nestin)、神経RNA結合タンパク  
 質ムサシ (Musashi)、ニューロフィラメントM  
 (NF-M; シグマ社 (Sigma, Inc.))、神  
 経特異的チューブリン (シグマ社 (Sigma, In  
 c.))、神経特異的エノラーゼ (インクスター社 (I  
 ncstar, Inc.))、微細管結合タンパク質2  
 (MAP2、ベーリンガーマンハイム (Boehr  
 inger Mannheim))、神経膠線維酸性タンパ  
 ク質、O4、または神経前駆細胞、ニューロン細胞また  
 は神経膠細胞に特異的な任意の他の検出可能なマーカー  
 の発現を示す、抗原性分子を含む。

【0049】あるいは、神経前駆細胞特異的、神経細胞  
 特異的または神経膠細胞特異的マーカーの発現は、特に  
 問わないが逆転写酵素介在性ポリメラーゼ連鎖反応 (R  
 T-PCR)、転写介在性増幅 (TMA)、逆転写酵素  
 介在性リガーゼ連鎖反応 (RT-LCR)、またはハイ  
 ブリダイゼーション分析のような、任意のマーカーをコ  
 ードするmRNA転写体を増幅および分析するための従  
 来の分子生物学的方法により検出される。神経前駆細  
 胞、ニューロン細胞または神経膠細胞に特異的なマーカー  
 (例えば、ネスティン (nestin)、神経RNA  
 結合タンパク質ムサシ (Musashi)、ニューロ  
 フィラメントM、神経特異的チューブリン、神経特異的  
 エノラーゼ、微細管結合タンパク質2、神経膠線維酸性タ  
 ンパク質、O4) をコードする核酸配列は既知であり、  
 ジーンバンク (GenBank) のようなデータベース  
 において利用可能である。当業者であれば、コンピュー  
 タ化アルゴリズム (例えば、パワーブラスト (Powe  
 rBLAST)、キューブラスト (QBLAST)、P  
 SI-ブラスト (BLAST)、PHI-ブラスト (B



LAST)、ギャップ化または非ギャップ化ブラスト (BLAST)、またはベイラー医科大学 (Baylor College of Medicine) サーバーを通じての「アライン (Align)」プログラム) を使用して、国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) のジーンバンク (GenBank) データベースのようなゲノムデータベースの配列類似性検索を行うことにより、プライマーまたはプローブとして使用するための他の有用なマーカー特異的配列を容易に決定することができる。(例えば、アルチュール、エス・エフ (Altchul, S. F.) ら、「ギャップ化ブラスト (BLAST) およびPSI-ブラスト (BLAST) : 新世代のタンパク質データベース検索プログラム」、*Nucleic Acids Res.* 25 (17) : 3389-402 [1997]; チャン、ジェイ (Zhang, J.) とマッデン、ティー・エル (Madden, T. L.)、「パワーブラスト (PowerBLAST) : 相互または自動配列解析および注釈のための新しいネットワークブラスト (BLAST) アプリケーション」、*Genome Res.* 7 (6) : 649-56 [1997]; マッデン、ティー・エル (Madden, T. L.) ら、「ネットワークブラスト (BLAST) サーバーのアプリケーション」、*Methods Enzymol.* 266 : 131-41 [1996]; アルチュール、エス・エフ (Altchul, S. F.) ら、「基本的なローカルアラインメント検索ツール」、*J. Mol. Biol.* 215 (3) : 403-10 [1990])。

【0050】場合により、ニューロンまたはニューロン様細胞への表皮基底細胞の分化転換を検出するために形態学的基準が追加的に使用される。例えば、ニューロンまたはニューロン様細胞は、細胞直径の3倍以上(約50ミクロンまたはそれ以上)の軸索突起、または軸索突起様突起を発現しうる。

【0051】本発明はまた、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する、表皮起源の分化転換した細胞に関する。本発明の細胞は、表皮基底細胞を、必ずしもそうとは限らないが、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞(星状細胞、稀突起神経膠細胞、または小神経膠細胞)の、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する細胞に分化転換する本発明の方法により生成することができる。細胞は、表皮基底細胞から分化転換した細胞の培養子孫細胞を含む。

【0052】「神経前駆細胞」は、生理学的特徴として、分化に適した生理学的条件(例えば、特定の神経栄養因子の存在)下で、ニューロン細胞または神経膠型細

胞、すなわち、ニューロン、星状細胞(すなわち、星状膠細胞)、稀突起神経膠細胞(すなわち、乏突起神経膠細胞)、および小神経膠細胞に特異的に関連した、1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を示す能力を有する外胚葉由来多能性幹細胞である。例えば、二能性神経前駆細胞は、毛様体神経栄養因子(CNTF)に暴露後に星状細胞に、または血小板由来成長因子(PDGF)に暴露後にニューロン細胞に分化する。(例えば、ジェイ・ケー・パーク(J. K. Park)ら、「二能性皮質前駆細胞は、ニューロンと神経膠細胞に対する相反する合図を階層的に処理する」、*J. Neurosci.* 19 (23) : 10383-89 [1999])。幾つかの神経前駆細胞は、ニューロンのみに分化しうる「神経に限定された」前駆細胞である。

【0053】神経前駆細胞の存在は、ニューロン細胞または神経膠細胞への発生および分化の過程を決定するための適切な生理学的条件下で、機能性試験により検出することができる。好ましくは、神経前駆細胞は、細胞骨格タンパク質ネスティン(nestin)および/または神経RNA結合タンパク質ムサシ(Musashi)(MSI)のような、任意の幾つかの明確な特異的マーカーの発現を検出することにより同定される。(例えば、ティー・ナガタ(T. Nagata)ら、「マウス神経RNA結合タンパク質、ムサシ1(Musashi 1)の構造、基本骨格力学およびC末端RNA結合ドメインのRNAとの相互作用」、*J. Mol. Biol.* 287 (2) : 315-30 [1999]; ピー・グッド(P. Good)ら、「CNS幹細胞および神経前駆細胞においておそらく発現されている神経RNA結合タンパク質である、ムサシ(Musashi)/Nrplの相同体をコードするヒトムサシ(Musashi)相同体1(MSI1)遺伝子」、*Genomics* 52 (3) : 382-84 [1998]; エス・サカキバラ(S. Sakakibara)ら、「マウスムサシ(Musashi)-1、哺乳動物CNS幹細胞において極めて濃縮された神経RNA結合タンパク質」、*Dev. Biol.* 176 (2) : 230-42 [1996])。

【0054】「ニューロン」細胞、または「ニューロン様」細胞は、感覚ニューロン、運動ニューロン、または介在ニューロン型細胞を含む、ニューロン型細胞に関連した1つまたはそれ以上の神経特異的な形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を示す細胞を含む。実施者は、特定の応用に関して、分化転換した細胞が特定型のニューロン細胞集団に属するかどうかを決定するために使用される特異的特徴の機能的基準またはサブセットを選択することができる。有用な基準となる特徴は、形態学的特徴(例えば、長い突起または軸索突起); 生理学および/または免疫学的特徴、例えば、神経特異

的マーカーまたは抗原のあるセットの発現（例えば、ニューロフィラメントM、神経特異的 $\beta$ -チューブリン、神経特異的エノラーゼ、微小管結合タンパク質2など）；神経伝達物質の合成（例えば、ドーパミン；チロシンヒドロキシラーゼ（ドーパミン合成における重要な酵素）の発現；またはガンマアミノ酪酸〔GABA〕）；神経伝達物質の受容体の存在；および／または膜興奮性および／または特定のサイトカインまたは成長因子に対する発生的応答のような生理学的特徴を含む。本発明の分化転換した細胞の利点は、特異的な外から供給されたシグナル分子の存在下でインビトロで、または特異的な微環境内でインビボで、これを操作して実施者の機能的な基準により明確になった多様なニューロン型にすることができることである。

【0055】神経膠細胞または「神経膠様」細胞は、神経膠細胞（例えば、星状細胞または稀突起神経膠細胞）に特異的な形態学的、生理学的および／または免疫学的特徴（例えば、星状膠細胞マーカーの神経膠線維酸性タンパク質（GFAP）または乏突起神経膠細胞マーカーのO4の発現）を含む、神経膠型細胞に関連した1つまたはそれ以上の神経膠特異的特徴を有する細胞を含む。

【0056】1つの実施態様において、分化転換した細胞は、神経前駆細胞における分化を誘導する細胞培養条件（例えば、ニューロトロフィンを含む栄養強化培地（例えば、37℃で5%CO<sub>2</sub>を含む空気中のDMEM/F12に加えてニューロン細胞成長補足物質B27〔ギブコ（Gibco）-BRL〕、10<sup>-7</sup>M全-transレチノイン酸および脳由来神経栄養因子〔BDNF；20ng/mL〕））下で、有糸分裂活性の欠乏を示す。

【0057】他の態様では、細胞は、GABA作動性細胞、すなわち、中枢神経系における支配的な阻害性神経伝達物質であるガンマアミノ酪酸を産生する細胞である。例えば、ラミニンでコーティングした表面に塗布した分化転換した細胞を全-transレチノイン酸（10<sup>-7</sup>M）およびBDNF（10ng/mL）により5～15日間処理すると、GABA作動性ニューロンまたはニューロン様細胞が発生する。

【0058】さらに別の態様では、分化転換した細胞は、ドーパミン作動性細胞、すなわち、ドーパミン、カテコールアミン神経伝達物質、およびホルモンを産生する細胞である。これらの細胞は、神経膠細胞調整培地およびソニックヘッジホッグ（sonic hedgehog）アミノ末端ペプチドによる分化転換後処理により生じる。

【0059】1つの態様において、分化転換した細胞は、神経膠線維酸性タンパク質（GFAP）の発現のような、神経膠細胞の形態学的、生理学的および／または免疫学的特徴を有する。

【0060】神経学的創傷または疾患に対する細胞治療

または遺伝子治療アプローチにおける使用を必要とする患者に、埋め込みおよび／または移植することができることは、本発明の分化転換した細胞の利点である。分化転換した細胞は、細胞増殖の工程を必要とすることなく直接使用することができるため、有利である。

【0061】本発明はまた、表皮基底細胞を起源とする本発明の分化転換した細胞から得られた細胞培養物に関する。細胞培養物は、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の形態学的、生理学的および／または免疫学的特徴（例えば、1つまたはそれ以上の特異的なマーカーの発現）を有する多数の細胞を含有する。この細胞培養物は、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞のインビトロ増殖に適した培養条件（例えば、当該分野において知られている、適切な温度、pH、栄養分、および成長因子）下で維持される。細胞培養物は、特異的な外から供給したシグナル分子の存在下で、追加のまたは異なる神経細胞特異的または神経膠細胞特異的なマーカーを発現するように操作することができる。

【0062】本発明の分化転換した細胞および細胞培養物は、その特徴および性質のため、ヒト神経系用の基本的バイオテクノロジーのツールとして有用である。さらには、本発明の分化転換した細胞および細胞培養物は、神経系疾患および障害用の細胞および遺伝子治療において使用するための技術的基準を満たす。第1に、本発明の分化転換した細胞および細胞培養物は、ニューロンの形態学的および機能的特徴を示すことができる：これらは、末端に成長円錐を有する長い軸索突起を発生させることができ、多くの神経特異的な遺伝子を発現し、そして分化を誘導する条件では増殖を続けない。従って、遺伝子治療および細胞治療における使用について、分化転換した細胞は、単一の可能性ある遺伝子または因子を送達することができるだけでなく、さらに神経再生のための基礎構造全体を与えることができる。

【0063】第2に、培養した分化転換した細胞は、増殖に適しておりかつ分化を誘導しない条件では、多能性神経系前駆細胞として増殖することができる。このため、これらの前駆細胞は、これらが暴露される環境の合図に応じて、多くの異なる型のニューロンまたはニューロン様細胞（例えば、GABA作動性またはドーパミン作動性細胞）になる能力を保持している。この広い適応性は、一旦移植されると、本発明の細胞が、多くの異なる宿主脳領域に適合し、かつ特定の宿主領域に特異的なニューロンに分化する能力を保持することを示唆している。分化転換したニューロンのこれらの固有の性質は、人工的な条件下で少量のニューロン分化を誘導することができる、既存の腫瘍原性細胞株とは異なる。

【0064】第3に、本発明の分化転換した細胞および細胞培養物の別の利点は、細胞および遺伝子治療のためにニューロンを生成させるために利用される幹細胞テクノロジーでは必要な細胞拡張の必要がないことである。

すなわち、本発明の分化転換した細胞は、直接移植のための数（数百万個の細胞）は足りている。要約すると、これらの分化転換した細胞および細胞培養物のユニークな特徴および性質によって、重要な科学および商業的可能性ある発明が得られる。

【0065】従って本発明はまた、ヒトを含む哺乳動物被験体の神経系において、インビボで局所分泌性調節因子を送達する方法に関する。この方法は、上述の本発明の方法による、ニューロン細胞の形態学的、生理学的および／または免疫学的特徴を有する細胞への、被験体からの表皮基底細胞の集団の分化転換を伴う。移植拒絶を回避するために、分泌性調節因子による処理を必要とする特定の被験体の表皮基底細胞が好ましい。分化転換工程の前、最中、または後に、上述の既知の方法により、前もって決定した分泌性調節因子、その生化学的前駆体、またはこの因子または前駆体のいずれかの生合成を触媒する酵素をコードするDNAを含んでなる発現ベクターにより、インビトロで細胞を遺伝子修飾し、そして遺伝子修飾された細胞を選択し、培養し、そして被験体に移植する。細胞のトランスフェクションまたは遺伝子修飾では、前もって決定された分泌性調節因子またはその前駆体、またはこの因子または前駆体のいずれかの生合成を触媒する酵素をコードするDNAを含んでなる発現ベクターを送達する。調節因子、前駆体、または酵素の遺伝子の発現は、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーターまたは神経特異的エノラーゼプロモーター）の転写制御下にある。遺伝子修飾した細胞による調節因子の分泌の増強が得られる。これは、電気化学的感覚、運動、または認識シグナルを伝達する接続のような、機能性ニューロン間接続の形成に依存しない。

【0066】分泌性調節因子の例は、ドーパミンおよび神経栄養因子（例えば、神経成長因子（NGF）、脳由来成長因子（BDGF）、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、インスリン様成長因子、毛様体神経栄養因子（CNTF）、または神経膠細胞由来神経栄養因子）を含む。本方法を使用して治療することができる神経系障害は、アルツハイマー病、糖尿病性ニューロパシー、タキソールニューロパシー、圧迫性ニューロパシー、AIDS関連ニューロパシー、筋萎縮性側索硬化症、大線維性（large fiber）ニューロパシー、ピンクリスチンニューロパシー、およびパーキンソン病を含む。

【0067】遺伝子修飾した分化転換細胞の移植は、従来法（例えば、定位注入）による。移植は、治療される特定障害に応じて、被験体の神経系内の適切な部位に行われる。

【0068】一例として、本方法は、主に脳の黒質のドーパミン放出ニューロンの変性およびこれに続く線条のドーパミン神経伝達物質の枯渇により生じるパーキンソ

ン病の治療において有利である。この変性の原因は、未知であるが、この疾患の運動変性症候は、本疾患の発症早期にドーパミン前駆体のL-ドーパを末梢に投与することにより軽減することができる。疾患が悪化を続けると、L-ドーパはもはや有効でなく、そして現在利用可能なさらなる治療法はない。開発されている1つの有望な治療法は、胎児脳から患者の脳の線条への高ドーパミンの黒質ニューロンの移植である。種々の臨床試験から得られた結果は、極めて楽観的であるが、1回の移植手術に十分な数の細胞を得るためには、10個もの胎児脳を必要とすることが推定される。この要求により、1つの治療様式として初代胎児ニューロンの移植の広い適用は実施不能である。しかしこの問題は、パーキンソン病の治療のための本発明の分化転換したニューロンまたはニューロン様細胞を利用することにより解決される。

【0069】ドーパミン産生細胞の移植が、重篤なパーキンソン病の最も有望な治療法であることは、今や広く認識されている。ドーパミンを産生するように遺伝子修飾された安定な細胞集団または細胞株が、有効な治療には必須である。チロシンヒドロキシラーゼ（TH）はドーパミン生合成の重要な酵素であるため、適切な発現ベクターへのTH遺伝子のクローニングは、治療法の第1工程である。ヒトTH cDNAは、真核生物発現ベクターにクローン化される。遺伝子送達後、発現ベクターの安定な組み込みを示す遺伝子修飾された細胞のクローンは、移植のために選択される。すなわち、本発明の分化転換した細胞は、チロシンヒドロキシラーゼ（TH）遺伝子の発現が増強されて産生される。

【0070】これらの細胞は、患者の線条または脳内に移植される。細胞は典型的には、磁気共鳴画像法（MRI）誘導定位法を使用することにより、尾状核および被殻に両側性に移植される。局所麻酔後、定位枠を頭蓋に固定する。そして尾状核と被殻をMRIにより視覚化する。次に、全身麻酔下、尾状核と被殻に4mm間隔で非常に細い定位針で約10パスを両側に作る。胎児ドーパミンニューロン突起は、数ミリメートルに成長して宿主の線条に神経を再分布させるため、約4mm間隔でのトラックの間隔あけの原理は重要である。内包後脚を回避するために、尾状核の針のトラックでは4つの軌跡、および被殻では6つのトラックが計算される。被殻および尾状核トラックの入口点は、脳表面の異なる2つの部位にある。被殻へのトラックは前頭面に対してほぼ垂直であり、一方尾状核へのアプローチは約30度の角度である。移植手術後、移植細胞はインサイチューでドーパミンを分泌して、被験体のパーキンソン病の症候を軽減する。

【0071】本発明はまた、本発明の分化転換した細胞を利用する、新規な神経成長（または神経栄養）因子を単離または同定する方法に関する。本方法は、増殖表皮基底細胞の集団を、ニューロン前駆細胞、ニューロン細

胞、または神経膠細胞に分化転換すること；分化転換した細胞を培養すること；培養細胞をインビトロで可能性ある神経成長因子に暴露すること；および細胞の生存、または細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある神経成長因子の作用の存在または非存在を検出することを伴う。分化転換した細胞は、分化転換した細胞の生理学的または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある神経成長因子の作用が存在するかどうかを測定するためにインビトロで評価される。例えば、あるとすればニューロンまたは神経膠細胞のいずれが神経前駆細胞から発生するか、特定の型の細胞の成熟度、および細胞生存の継続支持

（例えば、細胞数に及ぼす作用）を測定することができる。さらに、電気生理学的特性（パッチクランプ、異なる型の細胞内記録など）または分子生物学的性質（遺伝子発現プロファイル、細胞骨格の組織化、イオンチャネルおよび受容体の組織化など）に基づく実験技術を使用して、特定の型の細胞に及ぼす、可能性ある神経成長／神経栄養因子の作用を検出することができる。可能性ある因子は、必ずしもそうとは限らないが、単離化合物であってもよい；本発明の分化転換した細胞は、さらなる単離のための候補物質を検出するため、細胞の生存および機能性に及ぼす、可能性ある成長因子供給源（組織ホモジェネート、発現cDNAライブラリー産物など）の作用、またはその欠乏を試験、または評価するために使用することができる。

【0072】分化転換した表皮基底細胞を使用すると、脳からのニューロン型細胞を単離および培養する困難が回避され、そのため、新規な神経成長因子を同定する本発明の方法は、この領域の研究にとって1つの利益である。

【0073】この同じ利点は、上述の本発明の方法によりニューロン前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞に表皮基底細胞の集団を分化転換すること；分化転換した細胞を培養すること；培養細胞をインビトロで、可能性ある化学療法剤に暴露すること；および細胞の生存または該細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある化学療法剤の作用の存在または非存在を検出することにより、可能性ある化学療法剤（すなわち、薬物）を同定するための、表皮基底細胞から分化転換した細胞の本発明の使用方法にも関係する。細胞生存、細胞の形態学的または電気生理学的特性および／または分子生物学的性質を変化させる作用は、化学療法剤の活性を示す。可能性ある化学療法剤は、神経系障害を治療することを意図した物質であってよいが、または本方法は、任意の他の型の障害を治療することを意図または目的とした物質の、神経前駆細胞、ニューロン細胞または神経膠細胞の特徴を有する細胞に及ぼすその作用について試験するために使用することができる。電気生理学的特性（パッチクラ

ンプ、異なる型の細胞内記録など）または分子生物学的性質（遺伝子発現プロファイル、細胞骨格の組織化、イオンチャネルおよび受容体の組織化など）、さらには細胞生存に基づく実験的測定法は、特定の型の細胞に及ぼす、可能性ある化学療法剤の作用を検出するために使用することができる。可能性ある化学療法剤は、必ずしもそうとは限らないが、単離化合物であってもよい；本発明の分化転換した細胞は、さらなる単離および開発のための候補物質を検出するための細胞の生存および機能に及ぼす、可能性ある化学療法剤（組織ホモジェネート、発現cDNAライブラリー産物など）の作用を試験または評価するために使用することができる。培養してニューロンまたはニューロン様細胞に分化転換した表皮基底細胞は、幾つかの神経伝達物質および受容体複合体を発現することができるため、成熟ニューロンに分化すると、神経伝達物質受容体複体のユニークなプロファイルを示すこれらの細胞由来の細胞株が発生しうる。このようなニューロン細胞株は、可能性ある化学療法剤の設計およびスクリーニングのための有用な手段になりうる。

【0074】本発明はまた、遺伝子起源の神経系障害（例えば、アルツハイマー病）を治療するための可能性ある化学療法剤をスクリーニングするための、分化転換した細胞または細胞培養物の使用方法に関する。本方法は、可能性ある化学療法剤のスクリーニングの上述の方法により実施されるが、遺伝子起源の特定の神経系障害と診断されたヒト被験体由来の表皮基底細胞は、分化転換し、そして分化転換した細胞の生理学的または分子生物学的性質に及ぼす、可能性ある化学療法剤の作用がインビトロで評価される。本発明の分化転換した表皮基底細胞由来の異なる型のニューロン細胞は、可能性ある化学療法剤をスクリーニングするための新規な方法を提供する。例えば、神経系に影響する遺伝子欠損した患者からの表皮基底細胞の使用によって、この遺伝子欠損も有する種々の型のニューロン細胞集団の発生を誘導するように環境の合図を操作することができる。これらの細胞は、特異的なセットまたはプロファイルの神経伝達物質、受容体複合体、およびイオンチャネルを示す、罹患ニューロンまたはニューロン様細胞に及ぼす作用を有する可能性のある化学療法剤のスクリーニングのために使用することができる。

【0075】インビトロの特定のセットの環境条件下で、本発明の分化転換した細胞が、インビボの所定のニューロン集団の全ての生化学的、形態学的、および機能的特性を発現するかどうかにかかわらず、これらは、有望な新しい薬物または神経成長因子を同定、スクリーニング、または単離するための、ニューロンの少なくとも有用なシミュレーションを提供する。一旦化学物質の可能性が本発明の方法により同定されたら、さらに研究を行って神経系の特定細胞集団に及ぼすその実際の作用を

証明し、かつその臨床的有用性を確認する。すなわち、可能性ある化学療法剤をスクリーニングする本発明の方法は、特異的な脳機能の修飾に精密に狙いを定めた次世代の薬剤を発見および開発するのに有益である。

【0076】本発明はまた、表皮基底細胞を、神経前駆細胞、ニューロン細胞、または神経膠細胞の1つまたはそれ以上の形態学的、生理学および/または免疫学的特徴を有する細胞に、分化転換するためのキットに関する。このキットは、本発明の方法による表皮基底細胞の分化転換を促進するための材料の集合である。

【0077】本発明のキットは、好ましくは以下の発現ベクターおよび試薬を含む: NeuroD1、NeuroD2、ASH1、Zic1、Zic3、およびMyT1のような神経原性転換因子、またはその断片をコードするcDNA、または相同的な非ヒト対応物を含有する1つまたはそれ以上の発現ベクター、ヒトMSX1遺伝子および/またはヒトHES1遺伝子のセグメントまたは一部に対応する少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、または相同的な非ヒト対応物、レチノイドおよび少なくとも1つのニューロトロフィン(例えば、BDNF、CNTF、PDGF、NGF、NT-3、NT-4、および/またはソニックヘッジホッグ(sonic hedgehog))、またはこれらの任意の活性断片。必須ではないが好ましくは、本キットは、例えば患者自身の皮膚細胞から開始して、哺乳動物被験体の表皮基底細胞の分化転換用キット成分を使用するための説明書を含む。

【0078】本発明のキットに組み立てられる材料または成分は、その操作性と有用性を保持する任意の便利で適切な方法で貯蔵して、実施者に提供することができる。例えば成分は、溶解型、脱水型和、または凍結乾燥型であってよい;これらは、室温、冷蔵温度または凍結温度で提供することができる。本発明のキットは、好ましくは本発明の方法の任意または全てを有効に実施するための材料または成分を使用するための説明書を含む。

#### 【0079】

【発明の実施の形態】本発明の方法、分化転換した細胞、細胞培養物、およびキットの前記説明は、例示的なものであり、決して網羅的なものではない。ここで本発明は、以下の非限定例を参照しながらさらに詳細に説明される。

#### 【0080】

##### 【実施例】例I

表皮細胞培養物の調製および脱分化

成人の皮膚は、外科手術または皮膚生検から入手した。培養前に、できるだけ多くの表皮下組織を穏やかにこすり取って除去した。初代培養は、4~10個の2×2mm外植片/35mm組織培養皿を、15%ウシ胎児血清(ギブコ(GIBCO)-BRL、ライフテクノロジーズ社(Life Technologies, Inc.))、0.4μg/mlヒドロコルチゾン、および10

ng/ml表皮成長因子(コラボラティブ・リサーチ社(Collaborative Research, Inc.))を含むダルベッコ改変イーグル培地(ギブコ(GIBCO)-BRL、ライフテクノロジーズ社(Life Technologies, Inc.))で培養することにより開始した。培地は、3日毎に交換した。30~35日齢の培養物を次の実験のために使用した。トランスフェクションおよびさらなる処理の前に、分化した細胞層は、培養物を無Ca<sup>2+</sup>最小必須培地(ギブコ(GIBCO)-BRL、ライフテクノロジーズ社(Life Technologies, Inc.))でインキュベートすることによりはがした。一般に、無カルシウム培地は、10<sup>-6</sup>M未満のCa<sup>2+</sup>イオンを含有する。72時間後、基底上層を分離して、培養皿の振盪後除去した。この無カルシウム処理もまた、細胞が、表皮細胞の特徴であるサイトケラチンの発現をゆるめるにつれ、表皮基底細胞を脱分化させる。次に培養物は、正常Ca<sup>2+</sup>濃度、すなわち、全ての添加剤(すなわち、FCS(15%)、ヒドロコルチゾン(0.4μg/ml)、EGF(10ng/ml))を含有する2mMカルシウムイオンの培地に再供給して、5%CO<sub>2</sub>を含有する大気中で37℃で18~24時間培養した。

#### 【0081】例II

培養表皮細胞のトランスフェクション

表皮基底細胞は、Ca共沈プロトコール(ギブコ(GIBCO)-BRL、ライフテクノロジーズ社(Life Technologies, Inc.))、リポフェクタミン(Lipofectamine)試薬(ギブコ(GIBCO)-BRL、ライフテクノロジーズ社(Life Technologies, Inc.))、および免疫リボソーム(ホルムバーグ(Holmberg)ら、1994)を使用してトランスフェクションした。Ca共沈およびリポフェクタミン(Lipofectamine)試薬は、製造業者の指示通りに使用した。10μgのpRcCMVneo真核生物発現ベクター(インビトロジェン(Invitrogen))単独、またはβ-ガラクトシダーゼ(CMV-β-gal)、NeuroD1(CMV-ND1)、NeuroD2(CMV-ND2)、hASH1(CMV-hASH1)、Zic1(CMV-Zic1)、またはhMyT1(CMV-MyT1)cDNAのいずれかを含有するクローン化pRcCMVneoのいずれかを使用して、1つの35mm組織培養皿で細胞をトランスフェクションした。我々の実験室では、ジーンバンク(GenBank)からの配列情報を利用して全てのcDNAがクローン化された:受け入れ番号:hNeuroD1 D82347(配列番号:1および7);U50822(配列番号:2および8);hNeuroD2 U58681(配列番号:3および9);hASH1 L08

424 (配列番号: 4および10); hZic1 D76435 (配列番号: 5および11); hMyT1 M96980 (配列番号: 6および12)。全てのクローン化遺伝子はヒト起源であった。

【0082】オリゴヌクレオチドプライマーは、目的の配列に基づき設計して、RT-PCR法および鋳型としてヒト胎児脳mRNAを使用して完全長cDNAを増幅するために使用した。また、NeuroD1、NeuroD2およびhASH1 cDNAは、ヒト胎児脳cDNAライブラリー (ストラタジーン (Stratagene)) をスクリーニングすることにより単離した。全てのcDNA配列は、配列決定および網状赤血球溶解物インビトロ翻訳システム (アマシャム (Amersham)) を使用するインビトロ翻訳により証明した。

#### 【0083】例III

アンチセンスオリゴヌクレオチドの調製および使用  
ヒトMSX1アンチセンスオリゴヌクレオチド配列:

1) 5' -GACACCGAGTGGCAAAGAAGTCATGTC-3' (第1メチオニン) (MSX1-1; 配列番号: 13); および

2) 5' -CGGCTTCCTGTGGTCGGCCATGAG-3' (第3メチオニン) (MSX1-2; 配列番号: 14) を合成した。さらに、ヒト胎児脳cDNAライブラリーからヒト完全長HES1 cDNAを単離して、配列決定した (ストラタジーン (Stratagene))。ヒトHES1読み取り枠5'配列:

1) 5' -ACCGGGGACGAGGAATTTTCTCCATTATATCAGC (HES-1; 配列番号: 15) および中央配列:

2) 5' -CACGGAGGTGCCGCTGTTGCTGGGCTGGTGTGGTGTAGAC (HES1-2; 配列番号: 16) に対応する2つのアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成した。好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドは、既知の方法によりチオ修飾されている。従って、ヒトMSX1およびヒトHES1に対応するチオ修飾型のこれらのオリゴヌクレオチドを合成して、培地中および細胞中のオリゴヌクレオチドの安定性を増大させるために使用した。

【0084】以下に記述される実験プロトコールにおいて、オリゴヌクレオチドは、5~10  $\mu$ Mの濃度で直接培地に加えた。ランダムに合成したオリゴヌクレオチドおよびヒトアルブミンの配列に対応するオリゴヌクレオチドを、対照として使用した。

#### 【0085】例IV

分化転換を検出するための分析方法

ニューロン分化の1つのマーカーとして、ニューロフィラメントM発現の免疫組織化学的検出を選択した。細胞は、4%パラホルムアルデヒドで固定して、抗体製造業者 (シグマ社 (Sigma, Inc.)) が推奨する免疫組織化学的検出プロトコールにより処理した。ニュー

ロフィラメントM陽性細胞は、蛍光顕微鏡により計測した。ニューロン抗原に対するさらに幾つかの抗体を使用して、さらに詳細にニューロンへの基底細胞の分化転換の性状を解析した。神経特異的チューブリン (シグマ社 (Sigma, Inc.))、神経特異的エノラーゼ (インクスター社 (Inostar, Inc.))、微小管結合タンパク質2 (MAP2、ベーリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim))、およびニューロフィラメントミックス (Mix) (スターンバーガー (Sternberger)) に対する抗体を、抗体製造業者が推奨する通りに使用した。神経膠線維酸性タンパク質 (GFAP、インクスター (Inostar)) に対する抗体を使用して、表皮基底細胞から星状細胞の分化を検出した。さらに、形態学的基準を使用して、ニューロン細胞への表皮基底細胞の分化転換を検出した。細胞直径の3倍を超える (50ミクロン以上) 軸索突起または突起を有しており、かつ少なくとも1つのニューロンマーカー (抗原) を発現する細胞を、ニューロンとして計測した。

#### 【0086】例V

分化転換プロトコールおよび実験結果

神経原性bHLHおよび/またはZnフィンガー転換因子の発現、または過剰発現、および実質的に同時のMSX1および/またはHES1発現の抑制をもたらす神経調節物質の種々の組合せを試験して、表皮基底細胞の分化転換に及ぼすこれらの作用を確認した。これらの実験の結果は、表1に与えられる。

【0087】これらの実験では、最も高いトランスフェクション効率を得られるため、免疫リポソームトランスフェクション法が好ましい。Ca共沈、リポフェクタミン (Lipofectamine)、またはフュージン-6 (Fugene-6) (ベーリンガー・マンハイム社 (Boehringer Mannheim, Inc.)) のような当該分野で既知の、高いトランスフェクション効率を得られる他のトランスフェクション法を、免疫リポソームの代わりに使用することができる。トランスフェクションおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド処理後、細胞は全transレチノイン酸 ( $10^{-7}$ M) およびBDNF (20ng/ml) の存在下で5日間増殖後、免疫染色した。

【0088】表1は、ニューロンのニューロフィラメント発現細胞へのインビトロでの表皮基底細胞の変換をもたらす上述の分化転換法の結果を示す。神経原性bHLHおよび/またはZnフィンガー転写因子の同時発現またはほぼ同時の発現、およびMSX1および/またはHES1遺伝子の発現の抑制の種々の組合せを使用して、分化転換を開始させた。ニューロフィラメントM免疫染色および軸索突起、または突起の長さ (50ミクロン以上を軸索突起として計測した) の評価は、ニューロン細胞を同定するために利用した。pRCMVベクタープラ



スミドと、ランダムに合成したオリゴヌクレオチド、およびヒトアルブミンの配列に対応するオリゴヌクレオチドを使用した対照は、表皮基底細胞の分化転換を示さなかった。ニューロフィラメントMを発現する細胞を、蛍光顕微鏡により計測した。各処理につき5～7視野（各

視野は100～300細胞を含有する）の免疫染色細胞を計測した。

【0089】

【表1】

表 I  
表皮基底細胞の分化転換

処理	ニューロン細胞% (すなわち、ニューロフィラメントM発現%)
対照、非処理	0
過剰発現：	
NeuroD1	0.01
NeuroD2	0.03
ASH1	0
Zic1	0
MyT1	0
NeuroD1+Zic1	0.04
NeuroD2+Zic1	0.05
NeuroD1+NeuroD2+Zic1	0.05
NeuroD1+MyT1	0.02
NeuroD2+MyT1	0.03
NeuroD1+NeuroD2+MyT1	0.05
NeuroD1+NeuroD2+MyT1+Zic1	0.05
アンチセンスオリゴヌクレオチド：	
MSX1-1	0
MSX1-2	0
HES1-1	0
HES1-2	0
MSX1-1+MSX1-2+HES1-1+HES1-2	0
アンチセンスオリゴヌクレオチドと神経原性因子の過剰発現との組合せ	
NeuroD1+NeuroD2+MSX1-1+MSX1-2	0.5
NeuroD1+NeuroD2+HES1-1+HES1-2	0.8
NeuroD1+NeuroD2+MSX1-1+HES1-1	7
Zic1+MSX1-1+MSX1-2	0.05
Zic1+HES1-1+HES1-2	3
MyT1+MSX1-1+MSX1-2	0.01
MyT1+HES1-1+HES1-2	0.5
MyT1+MSX1-1+HES1-1	0.9
NeuroD1+Zic1+MSX1-1	11
NeuroD1+Zic1+MSX1-1+HES1-1	20
NeuroD1+MyT1+MSX1-1	10
NeuroD1+MyT1+MSX1-1+HES1-1	26
NeuroD1+Zic1+MyT1+MSX1-1+HES1-1	25

【0090】要約すると、ニューロンへの表皮細胞の分化転換は、ニューロン分化を正に調節する神経原性転写因子と、ニューロン分化の負の調節物質に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドとの発現の組合せ作用により最も良好に達成される。実験データは、ニューロンへの表皮細胞の分化転換の好適な方法が、bHLHとジンクフィンガー転写因子の両方の発現を含むことを示して

おり、これが、表皮分化の負の調節物質に対応する少なくとも1つのアンチセンスDNAの存在下で、ニューロン分化を正に調節する。さらに、2つの負の調節物質アンチセンスDNAの存在下の2つのbHLH転写因子の発現によって、かなり高いパーセントの分化ニューロンが得られた。

【0091】例VI



分化転換したニューロン細胞の性状解析

分化転換プロセスおよび新しく生成したニューロン細胞をさらに評価するために、ニューロンマーカータンパク質に対する特異的抗体による免疫染色を使用して、これらの細胞中の幾つかのニューロンマーカー遺伝子の発現を分析した。これらの実験において、神経原性遺伝子のトランスフェクションとアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の以下の組合せを使用した：

NeuroD1+Zic1+MSX1-1+HES1-1

NeuroD1+MyT1+MSX1-1+HES1-1

NeuroD1+Zic1+MyT1+MSX1-1+HES1-1

【0092】これらの実験の結果は、ニューロフィラメントM陽性の分化転換した細胞もまた、神経特異的チューブリン、神経特異的エノラーゼ、および微小管結合タンパク質2を発現することを示している。分化転換した細胞の多くのニューロン抗原の発現と形態学的変化（50ミクロン以上の軸索突起）は、分化転換の進行によって、細胞治療応用において使用することができる正常かつ生存可能なニューロン細胞が得られることを示している。さらに、本発明の新しく生成したニューロン細胞は、ニューロンの形態学および機能的基準を有する：これらは、末端に成長円錐のある長い軸索突起を発生させ、多くの神経特異的遺伝子を発現し、そして全transレチノイン酸（ $10^{-7}$ M）およびBDNF（20ng/ml）の存在下でのような、分化を誘導する条件で増殖を続けたい。

【0093】最後に、神経膠線維酸性タンパク質に対する抗体による処理表皮細胞培養物の染色は、少ない割合（約5%）の細胞がGFAPをも発現することを示している。これは、分化転換した細胞が、直接または間接に星状膠細胞の特徴を獲得すること示している。1つの可能な説明は、神経原性遺伝子の発現と神経発生のインヒビターの発現の遮断とは、ニューロンと星状膠細胞の両方にインビトロで分化するニューロン前駆細胞を形成させることである。

【0094】例VII

パーキンソン病における分化転換したニューロン細胞の遺伝子治療応用

パーキンソン病は、主として脳の黒質のドーパミン放出ニューロンの変性、およびその結果生じる線条のドーパミン神経伝達物質の潤渇に起因する。この変性の原因は未知であるが、この疾患の運動変性症候は、疾患の発症早期でドーパミン前駆体のL-ドーパを末梢投与することにより軽減させることができる。疾患が悪化を続けると、L-ドーパはもはや有効でなく、そして現在利用可能なさらなる治療法はない。開発されている1つの有望な治療法は、胎児脳から患者の脳の線条への高ドーパミ

ンの黒質ニューロンの移植である。種々の臨床試験から得られた結果は、極めて楽観的であるが、1回の移植手術のための充分な数の細胞を得るためには、10個もの胎児脳を必要とすることが推定される。この要求により、1つの治療様式として初代胎児ニューロンの移植の広い適用は実施不能である。しかしこの問題は、パーキンソン病の治療のための本発明の分化転換したニューロン細胞の利用により解決される。

【0095】ドーパミン産生細胞の移植が、重篤なパーキンソン病の治療の最も有望な治療であることは、今や広く認識されている。ドーパミンを産生するように遺伝子操作された安定な細胞集団または細胞株は、有効な治療には必須である。チロシンヒドロキシラーゼ（TH）は、ドーパミン合成の重要な酵素であり、適切な発現ベクターへのこの遺伝子のクローニングは、治療の第1工程である。すなわち、ヒトTH cDNAは、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメント、神経特異的エノラーゼ）の制御下で真核生物発現ベクターにクローン化される。発現作成体は、高効率トランスフェクションプロトコール（リポフェクタミン（Lipofectamine）、Ca共沈など）を使用して患者の表皮基底細胞中にトランスフェクションされ、続いて発現ベクターの安定な組み込みを示すクローンの選択が行われる。これらのクローンは、THを発現する新しく生成したニューロンを得るための分化転換法のために使用される。すなわち、チロシンヒドロキシラーゼ（TH）遺伝子を発現する、本発明の分化転換した細胞に由来するヒトニューロンが産生される。これらの細胞が患者の線条または脳に移植される。第1に細胞は、磁気共鳴画像法（MRI）誘導定位法を使用することにより、尾状核および被殻に両側性に移植される。局所麻酔の投与後、定位枠を頭蓋に固定する。そして尾状核と被殻がMRIにより視覚化される。次に、全身麻酔下、尾状核と被殻に4mm間隔で非常に細い定位針で約10パスを両側に作る。胎児ドーパミンニューロン突起は、数ミリメートルに成長して宿主の線条に神経を再分布させるため、約4mm間隔でのトラックの間隔あけの原理は重要である。内包後脚を回避するために、尾状核の針のトラックでは4つの軌跡、および被殻では6つのトラックが計算される。被殻および尾状核トラックの入口点は、脳表面の異なる2つの部位にある。被殻へのトラックは前頭面に対してほぼ垂直であり、一方尾状核へのアプローチは約30度の角度である。

【0096】例VIII

脳への神経成長因子の送達のための分化転換したニューロン細胞の遺伝子治療応用

本発明の分化転換したニューロン細胞は、潜在的に興味ある神経成長（神経栄養）因子をコードする核酸によりトランスフェクションすることができる。種々の会社により現在臨床試験中または充分な開発下の成長因子の主

たる例を、以下の表IIに列挙する。これまで、多くの成長因子は、多くの異なる集団のニューロンおよび非神経組織に影響するため、脳および神経系に及ぼす成長因子の作用の試験は、副作用の顕著なリスクを有するこれらの因子の大用量の直接の末梢注射に限定されていた。こ

れらの問題は、これらの成長因子を安定に発現し、かつ移植後に成長因子を分泌する、分化転換したニューロン細胞株を作成することにより克服することができる。

【0097】

【表2】

表II  
神経栄養因子および疾患

神経栄養因子	疾患
神経成長因子 (NGF)	アルツハイマー病
	糖尿病性ニューロパシー
	タキソールニューロパシー
	圧迫性ニューロパシー
	AIDS関連ニューロパシー
脳由来成長因子 (BDNF)	筋萎縮性側索硬化症
ニューロトロフィン3 (NT-3)	大線維性ニューロパシー
インスリン様成長因子 (IGF)	筋萎縮性側索硬化症
	ピンクリスチンニューロパシー
	タキソールニューロパシー
毛様体神経栄養因子 (CNTF)	筋萎縮性側索硬化症
神経膠由来神経栄養因子	パーキンソン病

【0098】幾つかの神経学的症状（表IIを参照のこと）を治療するための方法として、神経栄養因子の局所送達を示唆されてきた。患者自身の皮膚からの分化転換した表皮細胞は、神経栄養因子送達の輸送手段である。ヒト神経栄養因子cDNAは、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントまたは神経特異的エノラーゼ）の制御下で真核生物発現ベクター中にクローン化される。発現作成体は、高効率トランスフェクションプロトコール（リポフェクタミン（Lipofectamine）、Ca共沈など）を使用して表皮基底細胞中にトランスフェクションされる。この手順に続いて、発現ベクターの安定な組み込みを示すクローンの選択が行われる。次にこれらのクローンは、特定の神経栄養因子を顕著に高レベルで発現する新しく生成したニューロンを得るための分化転換法に使用される。これらの神経栄養因子を発現するニューロン細胞は、例VIIに記載されるように、患者脳および／または神経系に、神経栄養因子送達を必要とする位置に移植される。

【0099】例IX

神経外傷、卒中および神経変性疾患の治療法としての分化転換したニューロン細胞の細胞治療応用  
多くの神経学的疾患では、パーキンソン病とは異なり、症候の基礎にある原因を単一因子に帰すことができない。この状態が、遺伝子治療による単一遺伝子の導入または細胞治療による単一ニューロン型置換という治療アプローチを無効にしている。むしろ消失または罹患した宿主ニューロン細胞またはさらにニューロン回路網の、健常細胞およびニューロン回路網による置換が必要とされる。本発明により我々は、患者自身の表皮基底細胞とは異なる型のニューロンを発生させることができる。こ

れらの新しく生成したニューロンは、置換治療に使用することができる機能性ニューロン回路網の形成を刺激するために、別々にまたは一緒に培養することができる。あるいは、異なる型のニューロンを移植し誘導して、脳内または脊髄内で、インサイチューでそれら自体および宿主ニューロンとの間の機能性接続を形成させることができる。生成したニューロンが種々の型のニューロンにインビトロおよびインビボでデノボ分化する能力によって、このアプローチは、神経系における複雑な構造および回路網の置換のために特に強力かつ有用である。

【0100】神経系における局所回路の回復の一例は、損傷脊髄における機能性「パターンジェネレータ」の形成である。幾つかのデータは、パターンジェネレータがヒトにおいて機能しており、そしてさらに物理療法により脊髄損傷患者における足踏みおよび脚の使用を刺激していることを証明している。（総説に関しては、ウィッケルグレン、アイ（Wickelgren, I.）、1998、「脊髄に歩くことを教える」、Research News, Science 279, 319-321、1998を参照のこと）。パターンジェネレータは、求心性感覚ニューロンと運動ニューロンを接続する異なる型の介在ニューロンを伴う。分化転換した表皮基底細胞は、パターンジェネレータの機能に必要な全ての主要な型のニューロン細胞を形成するように処理される。ここで細胞は、自然なシナプス形成が起こるように一緒に混合する。パターンジェネレータは、主要な興奮性（グルタミン酸作動性、コリン作動性）および阻害性（GABA作動性のレンショー細胞を含むグリシン作動性）ニューロンからなるため、第1に、これらの型のニューロンが上述の本発明の方法により作成される。第2

に、第1工程で産生された興奮性および阻害性ニューロンを同時培養で増殖させて、ニューロン細胞の間の機能的接続の形成を刺激する。この工程によって、患者の損傷脊髄に移植されることになる細胞の凝集体が得られる。代替アプローチは、異なる型のニューロン細胞を別々に発生させ、脊髄への移植の前にこれらを混合することであろう。多数の異なる興奮性および阻害性ニューロンの移植を可能にするこれらの方法を使用することにより、脊髄の局所機能を支持することができる機能的セットのニューロン接続が発生する。

#### 【0101】例X

新規な成長因子の検索における研究手段としての分化転換したニューロン細胞の使用

現代の神経生物学の中心原理の1つは、全てのニューロンでなくとも主要な投射ニューロンのそれぞれが、これらの標的細胞に到達し生存するために特異的シグナル（栄養因子）を必要とすることである。多くの疾患におけるニューロパシーは、このような成長因子により引き起こされるか、またはこれらの欠損を伴う。これらの成長因子は、次世代の神経系障害の予防薬および治療薬であり、このため、バイオテクノロジー産業で、新規な成長因子の検索および開発のために巨額の資金が投入されている。

【0102】成熟ニューロンが、分化転換したニューロンから産生するという観察に内在するものは、細胞の型の最終決定、成熟度、および細胞生存の継続的支持を測定するために、これらの細胞を使用して種々の成長因子を試験することができるという事実である。これまでに知られている神経系におけるほとんどの成長因子は、末梢神経に及ぼすこれらの作用により発見され、そしてこれらは脳内に存在する成長因子の非常に小さい割合である可能性が高い。

【0103】主として特定の型のニューロン細胞を脳から単離しかつ明確な培養条件で維持することが困難であるため、脳からの成長因子の検索は困難であった。分化転換した表皮細胞の使用はこの問題を克服し、可能性ある成長因子をスクリーニングするための新しい測定法に道を開く。

【0104】分化転換した表皮基底細胞から作成される異なる型のニューロン細胞は、新しいおよび既に性状解析された成長／神経栄養因子の作用の発見および分析のための新規な研究手段を提供する。表皮基底細胞は、特定のサブタイプのニューロンを特徴とする異なる型のニューロン細胞に分化転換する。これらの特異的なニューロン細胞は、細胞の生存および機能に及ぼす可能性ある成長因子供給源（組織ホモジェネート、発現cDNAライブラリー産物など）の作用を試験または測定するために使用される。例えば細胞数は、成長因子への暴露後ニューロン細胞の生存の分析のために計測される。当該分野において既知のこれらのニューロンの機能の広範囲の

実験的分析を実施して、新しく生成したニューロンに及ぼすこれらの新規な成長因子の作用を測定することができる。電気生理学的特性（パッチクランプ、異なる型の細胞内記録など）および分子生物学的性質（遺伝子発現プロファイル、細胞骨格の組織化、イオンチャネルおよび受容体の組織化など）に基づく実験技術は、特定の型の細胞に及ぼす可能性ある神経成長／神経栄養因子の作用を検出するために使用される。

#### 【0105】例XI

薬物スクリーニングにおける研究手段としての分化転換したニューロン細胞の使用

脳からますます多くの神経伝達物質受容体およびシグナル伝達タンパク質が同定されるにつれ、1つの神経伝達物質が1つの受容体を活性化するという定説は、単純化しすぎであることが明らかになっている。ニューロンの多くの受容体複合体は、幾つかの遺伝子によりコードされるタンパク質サブユニットからなり、そして各遺伝子は、多くの異なる変種タンパク質を合成する。これらの変種によって、広範な可能性ある受容体組合せが生じるのであって、1つの神経伝達物質と相互作用できる単一受容体が生じるのではない。結果として、ある範囲のシグナル出力が、単一の神経伝達物質作用により生み出される。あるニューロンである神経伝達物質によりもたらされる特異的シグナルは、この細胞によりどの受容体複合体が産生されるかに依存する。すなわち、細胞の多様性は分子の多様性に一致し、脳機能の複雑さの基になる主要な構造要素を構成する。

【0106】従来の薬理学による薬物の発見は、全脳ホモジェネートおよび動物を使用してこのような複雑さの知識なしに行われてきた。これらの研究は、たいいてい広い作用と副作用をもつ神経伝達物質の類似体を生み出した。特異的脳機能の修飾を目的とした次世代の薬剤は、神経伝達物質、受容体複合体、およびイオンチャネルのある特異的なプロファイルを示すニューロンに対する可能性ある化学物質をスクリーニングすることにより得られるかも知れない。

【0107】培養でニューロンに分化転換した表皮基底細胞は、幾つかの神経伝達物質および受容体複合体を発現しうる。成熟ニューロンに分化すると神経伝達物質受容体複合体のユニークなプロファイルを示すこれらの細胞由来の細胞株が発生しうる。このようなニューロン細胞株は、可能性ある薬物の設計およびスクリーニングのための有用な手段になるであろう。

【0108】インビトロの特定のセットの環境条件下で、本発明の分化転換した細胞が、インビボの所定のニューロン集団の全ての生化学的、形態学的、および機能的特性を発現するかどうかにかかわらず、これらは、有望な新しい薬物または神経成長因子を同定、スクリーニング、または単離するための、ニューロンの少なくとも有用なシミュレーションを提供する。一旦化学物質の可

能性が本発明の方法により同定されると、さらに研究を行って、神経系の特定細胞集団に及ぼすその実際の作用を証明しかつその臨床的有用性を確認することができ。すなわち、可能性ある化学療法剤をスクリーニングする本発明の方法は、特異的な脳機能の修飾に精密に狙いを定めた次世代の薬剤を発見および開発するのに有益である。

【0109】本発明の分化転換した表皮基底細胞から生成した異なる型のニューロン細胞は、可能性ある薬物をスクリーニングするための新規な方法論を提供する。例えば、神経系に影響する遺伝子欠損した患者からの表皮基底細胞の使用によって、この遺伝子欠損も有する種々の型のニューロン細胞を発生させることが可能になる。これらの細胞は、罹患ニューロンに及ぼす作用を潜在的に有する薬物のスクリーニングのために使用することができる。表皮基底細胞は、所望のサブタイプのニューロンの特徴を有する種々の型のニューロン細胞に分化転換する。これらの特異的なニューロン細胞は、細胞の生存および機能に及ぼす、可能性ある薬物の作用を試験または測定するために使用される。薬物への暴露後、ニューロン細胞の生存の分析のために、細胞数が計測される。広い範囲の電気生理学的（パッチクランプ、異なる型の

細胞内記録など）および分子生物学的（遺伝子発現プロフィール、細胞骨格の組織化、イオンチャネルおよび受容体の組織化など）方法は、特定の型の細胞に及ぼす、可能性ある薬物の作用を検出するために使用することができる。

【0110】要約すると、本発明の分化転換神経細胞テクノロジーは、細胞治療と遺伝子治療の両方の領域において神経系障害を治療するための広く重要な可能性を提供し、さらには研究および薬物スクリーニングのためのヒトニューロンの可能性ある新しい供給源を提供する。

【0111】本発明は、現在最も実際的かつ好適な実施態様であると考えられるものに関して記載することができるが、本発明は、開示された実施態様に限定されないと理解すべきであり、それどころか、本発明は、本発明の説明および添加した請求項の精神と範囲内に含まれる種々の修飾および同等な変更をカバーするものである。すなわち、本発明中の変法は、明細書に記載され請求項に定義される本発明の新規な側面から逸脱することなく行うことができると理解すべきである。

【0112】

【配列表】

```

<110> Cedars-Sinai Medical Center
Michel F. Levesque, M.D.
Toomas Neuman, Ph.D.
<120> Transdifferentiation of Transfected Epidermal
Basal Cells Into Neural Progenitor Cells, Neuronal Cells
And/Or Glial Cells
<130> CEDAR 044303
<140> 09/234, 332
<141> 1999-01-20
<160> 16
<170> FastSEQ for Windows Version 3.0
<210> 1
<211> 2502
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> gene
<222> (0)... (0)
<223> Neuro D1 gene: Genbank accession D82347
<400> 1
cggccacgac acgaggaatt cgcccacgca ggaggcacgg cgtccggagg cccagggtt 60
atgagactat cactgctcag gacctactaa caacaagga aatcgaaaca tgaccaaatc 120
gtacagcgag agtgggctga tgggcgagcc tcagcccaa ggtcctcaa gctggacaga 180
cgagtgtctc agttctcagg acgaggagca cgaggcagac aagaaggagg acgacctga 240
agccatgaac gcagaggagg actcactgag gaacggggga gaggaggagg acgaagatga 300
ggacctggaa gaggaggaag aagaggaaga ggaggatgac gatcaaaagc ccaagagacg 360
cgccccaaa aagaagaaga tgactaaggc tcgcctggag cgttttaaat tgagacgcat 420
gaaggctaac gcccgggagc ggaaccgcat gcacggactg aacgcggcgc tagacaacct 480

```

```

gcgcaagggtg gtgccttgct attctaagac gcagaagctg tccaaaatcg agactctgcg 540
cttggccaag aactacatct gggctctgtc ggagatcctg cgctcaggca aaagcccaga 600
cctgggtctcc ttcgttcaga cgctttgcaa gggcttatcc caaccacca ccaacctggt 660
tgggggctgc ctgcaactca atcctcggac ttttctgcct gagcagaacc aggacatgcc 720
ccccacactg ccgacggcca gcgcttcctt cctgttacac ccctactcct accagtcgcc 780
tgggctgccc agtccgcctt acggtacat ggacagctcc catgtcttcc acgttaagcc 840
tccgccgcac gcctacagcg cagcgctgga gcccttcttt gaaagccctc tgactgattg 900
caccagccct tcctttgatg gacccctcag cccgccgctc agcatcaatg gcaacttctc 960
tttcaaacac gaacgctccg ccgagtttga gaaaaattat gcctttacca tgcactatcc 1020
tgacgcgaca ctggcagggg cccaaagcca cggatcaatc ttctcaggca ccgctgcccc 1080
tcgtgctgag atccccatag acaatattat gtccttcgat agccattcac atcatgagcg 1140
agtcatgagt gcccagctca atgccatatt tcatgattag aggcacgcca gtttcacat 1200
ttccgggaaa cgaaccact gtgcttacag tgactgtcgt gtttcaaaa ggcagccctt 1260
tggtactac tgctgcaaag tgcaataact ccaagcttca agtgatatat gtatttattg 1320
tcattactgc ctttgaaga aacaggggat caaagttcct gttcacctta tgtattattt 1380
tctatagctc ttctatttaa aaaataaaaa aatacagtaa agtttaaaaa ataccaccag 1440
aatttggtgt ggctgtattc agatcgtatt aattatctga tcgggataac aaaatcacia 1500
gcaataatta ggatctatgc aatttttaaa ctagtaatgg gccaatataa atatataaa 1560
atatataatt ttcaaccagc attttactac ttgttacctt tcccatgctg aattattttg 1620
ttgtgatttt gtacagaatt tttaatgact ttttataatg tggatttcct attttaaaac 1680
catgcagctt catcaatttt tatacatatc agaaaagtag aattatatct aattatata 1740
aaataattta actaatttaa accagcagaa aagtgcctag aaagtattg tgttgcctta 1800
gcacttcttt cctctccaat tgtaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaattg 1860
cacaatttga gcaattcatt tcactttaaa gtctttccgt ctccctaaaa taaaaaccag 1920
aatcataatt ttcaagagga gaaaaaatta agagatacat tccctatcac aacatatcaa 1980
ttcaacacat tacttgaca agcttgata tacatattat aaatagatgc caacataccc 2040
ttctttaaat cacaagctgc ttgactatca catacaattt gcactgttac tttttagctc 2100
tttactcett tgcattccat gattttacag agaactctgaa gctattgatg tttccagaaa 2160
atataaatgc atgattttat acatagtcac ccccatgggt ggttgtcata tattcatgta 2220
ataaatctga gcctaaatct aatcaggttg ttaatgttgg gagttatatc tatagtagtc 2280
aattagtaca gtagcttaaa taaattcccc ccatttaatt cataattaga acaatagcta 2340
ttgcatgtaa aatgcagctc agaataagtg ctgtttgaga tgtgatgctg gtaccactgg 2400
aatcgatctg tactgtaatt ttgtttgtaa tcctgtatat tatggtgtaa tgcacaattt 2460
agaaaacatt catccagttg caataaaata gtattgaaag tg 2502

```

<;210>; 2

<;211>; 1676

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;220>;

<;221>; gene

<;222>; (0)... (0)

<;223>; Neurogenic helix-loop-helix protein (Neurod 1)

gene

Genbank accession J50822

<;400>; 2

```

acatcgatta actttttctc agaggcattc attttgtaat gggcaggtac ttttcgcaag 60
catttgtaaa ggttttagga gtggaagctg aaggcgatct ttcttttgat atagcgtttt 120
tctgcttttc tttctgtttg cctctccctt gttgaatgta ggaaatcgaa acatgaccaa 180
atctacagc gagagtgggc tgatgggcga gcctcagccc caaggtcctc caagctggac 240
agacgagtgt ctgagttctc aggacgagga gcacgaggca gacaagaagg aggacgacct 300

```

cgaagccatg aacgcagagg aggactcact gaggaacggg ggagaggagg aggacgaaga 360  
tgaggacctg gaagaggagg aagaagagga agaggaggat gacgatcaaa agcccaagag 420  
acgcggcccc aaaaagaaga agatgactaa ggctcgccctg gagcggttta aattgagacg 480  
catgaaggct aacgcccggg agcggaaccg catgcacgga ctgaacgcgg cgctagacaa 540  
cctgcgcaag gtggtgcctt gctattctaa gacgcagaag ctgtccaaaa tcgagactct 600  
gcgcttgccc aagaactaca tctgggctct gtcggagatc tcgcgctcag gcaaaagccc 660  
agacctggtc tccttcgttc agacgctttg caagggttta tccaacca ccaccaacct 720  
ggttgccggc tgccctgaac tcaatcctcg gacttttctg cctgagcaga accaggacat 780  
gccccgcac ctgccgacgg ccagcgcttc ctccctgta caccctact cctaccagtc 840  
gcctgggctg ccagtcgcg cttacggtac catggacagc tcccatgtct tccacgttaa 900  
gcctccgccc cagccctaca gcgcagcgct ggagcccttc tttgaaagcc ctctgactga 960  
ttgaccagc ccttcctttg atggaccct cagcccgcg ctcagcatca atggcaactt 1020  
ctctttcaaa cacgaaccgt ccgccgagtt tgagaaaaat tatgccttta ccatgacta 1080  
tcctgcagcg aactggcag gggcccaag ccacggatca atcttctcag gcaccgctgc 1140  
ccctcgctgc gagatccca tagacaatat tatgtccttc gatagccatt cacatcatga 1200  
gcgagtcatg agtcccagc tcaatgccat attcatgat tagaggcagc ccagtttcac 1260  
catttccggg aaacgaacc actgtgctta cagtactgt cgtgtttaca aaaggcagcc 1320  
ctttgtact actgctgcaa agtgcaaata ctccaagctt caagtgatat atgtatttat 1380  
tgtcattact gcctttgaa gaaacagggg atcaaagttc ctgttcacct tatgtattat 1440  
tttctataga ctctctatt ttaaaaaata aaaaaataca gtaaagtta aaaaatacac 1500  
cacgaatttg gtgtggctgt attcagatcg tattaattat ctgatcgga taacaaaatc 1560  
acaagcaata attaggatct atgcaattt taaactagta atgggccaat taaaatatat 1620  
ataaatatat attcaacca gcattttact acttgttacc tcccatgctg aattat 1676

<;210>; 3

<;211>; 1550

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;220>;

<;221>; gene

<;222>; (0)... (0)

<;223>; Neurogenic basic-helix-loop-helix protein (Neuro

D2) gene Genbank Accession U58681

<;221>; unsure

<;222>; (1219)... (1226)

<;223>; n at 1219 and 1226; n = A, T, G, or C

<;400>; 3

ccccctactt tgtgtgtgt gtcctccctt cccgccgcg gggcgccctc aggcaccatg 60  
ctgaccgcc tggtcagcga gcccgccctt ctctcgacg tgcccaagtt cgccagctgg 120  
ggcgacggcg aagacgacga gccgaggagc gacaagggcg acgcgccgcc accgccaccg 180  
cctgcgcccg ggccaggggc tccggggcca gcccgggcgg ccaagccagt ccctctccgt 240  
ggagaagagg ggacggaggc cacgttgcc gaggtcaagg aggaaggcga gctgggggga 300  
gaggaggagg aggaagagga ggaggaagaa ggactggacg aggcggaggg cgagcgcccc 360  
aagaagcgcg ggccaagaa gcgcaagatg accaaggcgc gcttgagcgc ctccaagctt 420  
cgcgcgaga aggcgaacgc gcgggagcgc aaccgcatgc acgacctgaa cgagccctg 480  
gacaacctgc gcaagggtgt gccctgctac tccaagacgc agaagctgtc caagatcgag 540  
acgtgcgcc tagccaagaa ctatatctgg gcgctctcgg agatcctgcg ctccggcaag 600  
cgccagacc tagtgtcta cgtgcagact ctgtcaagg gtctgtcga gccaccacc 660  
aatctgttg cgggtgtct gcagctcaac tctcgcaact tctcacgga gcaaggcgcc 720  
gacgggtccg gccgttcca cggtcgggc gggcggttcg ccatgcacc ctaccgtac 780  
ccgtgctcgc gcctggcggg gcacacagtgc caggcgccg gcggcctggg cggcggcgcg 840

gcgcacgccc tgcggaccca cggctactgc gccgcctacg agacgctgta tgcggcggca 900  
ggcgggtggcg gcgcgagccc ggactacaac agctccgagt acgagggccc gctcagcccc 960  
ccgctctgtc tcaatggcaa cttctcactc aagcaggact cctcgcccga ccacagagaaa 1020  
agctaccact actctatgca ctactcggcg ctgcccgggt cgcgggccac gggccacggg 1080  
ctagtcttcg gctcgtcggc tgtgcgcggg ggcgtccact cggagaatct cttgtcttac 1140  
gatatgcacc ttcaccacga ccggggcccc atgtacgagg agctcaatgc gttttttcat 1200  
aactgagact tcgcgccgnc tcctncttt ttcttttgcc tttgcccgcc cccctgtccc 1260  
cagccccag agcgcaggga caccceccatc ctaccccggc gccgggcgcg gggagcgggc 1320  
caccggtcct gccgctctcc tggggcagcg cagtctgtt acctgtgggt ggctgttccc 1380  
aggggcctcg cttccccag gggactcgcc ttctctcccc aagggttccc ctcctcctct 1440  
ctcccaagga gtgcttctcc agggacctct ctccgggggc tccctggagg caccctccc 1500  
ccattcccaa tatcttcgct gaggtttcct cctccccctc ctccctgcag 1550

<;210>; 4

<;211>; 1635

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;220>;

<;221>; gene

<;222>; (0)... (0)

<;223>; Achaete scute homologous protein (ASH1) gene;

Genbank accession L08424

<;400>; 4

cccagagacc ggccgaagag agcgcagcct tagtaggaga ggaacgcgag acgcggcaga 60  
gcgcgttcag cactgacttt tgtgctgct tctgttttt ttttcttag aaacaagaag 120  
gcgcagcgg cagcctcaca cgcgagcgcc acgcgaggct cccgaagcca acccgcaag 180  
ggaggagggg agggaggagg agggggcgtg caggaggagg aaaaagcatt ttcaccttt 240  
ttgtcccaac tctaagaagt ctccgggga tttgtatat atttttaac ttccgtcagg 300  
gtccccgtt catatttctt tttcttccc tctctgttc tgcaccaag ttctctctgt 360  
gtccccctcg gggggcccgcc acctcgcgtc ccggatcgct ctgattccgc gactccttg 420  
ccgcccgtgc gcatggaaag ctctgccaag atggagagcg gcggcgccgg ccagcagccc 480  
cagccgcagc cccagcagcc ctctctgccg ccgcagcct gtttctttgc caggccgca 540  
ggcgcggcgg ccgcagccgc cgcagcggca gcgcagagcg cgcagcagca gcagcagcag 600  
cagcagcagc agcagcagca gcaggcgccg cagctgagac cggcgccga cggccagccc 660  
tcagggggcg gtcacaagtc agcggccaag caagtcaagc gacagcgctc gtcttcgccc 720  
gaactgatgc gctgcaaacg ccggctcaac ttcagcggtt ttggctacag cctgccgcag 780  
cagcagccgg ccgcccgtggc gcgcccgaac gagcgcgagc gcaaccgct caagtggtc 840  
aacctgggct ttgccaccct tcgggagcac gtccccaacg gcgcggccaa caagaagatg 900  
agtaaggtag agacactgcg ctccggcggtc gactacatcc gcgcgctgca gcagctgctg 960  
gacgagcatg acgcgggtgag cggcccttc caggcaggcg tcctgtcgcc caccatctcc 1020  
cccaactact ccaacgactt gaactccatg gccggctcgc cggctctatc ctactcgtcg 1080  
gacgagggct cttacgaccc gctcagcccc gaggagcagg agcttctcga cttaccaaac 1140  
tggttctgag gggctcggcc tggtcaggcc ctggtgcgaa tggactttgg aagcagggtg 1200  
atgcacaac ctgcatcttt agtgctttct tgtcagttgc gttgggaggg ggagaaaagg 1260  
aaaagaaaaa aaaagaagaa gaagaagaaa agagaagaag aaaaaaacga aaacagtcaa 1320  
ccaaccccat cgccaactaa gcgaggcatg cctgagagac atggctttca gaaaacggga 1380  
agcgtcaga acagtatctt tgactccaa tcattcacgg agatatgaag agcaactggg 1440  
acctgagtca atgcgcaaaa tgcagcttgt gtcaaaaagc agtgggctcc tggcagaagg 1500  
gagcagcaca cgcgttatag taactcccat caccttaac acgcacagct gaaagtctt 1560  
gtcgggtccc cttcacctcc ccgcccttc ttagagtga gttcttagcc ctctagaaac 1620  
gagttggtgt ctttc 1635



<;210>; 5  
 <;211>; 3138  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Homo sapiens  
 <;220>;  
 <;221>; gene  
 <;222>; (0)... (0)  
 <;223>; Zic 1 Protein gene; Genbank Acession D76435  
 <;400>; 5

```

cgggtgccat gcagctttct ctaatttgc ctcagttcct ggctatgaat tgctaaacta 60
tcagtctcgc gctcaccgcc cggctgagga ggtgaaagt tctccccagg aagataaacc 120
gcaaaagaca tatattgtgc atgatttgcg ctttttcttt ggctttttct ttctttcttc 180
acccccccac ccactttttt tttttttttt ttcaaaaagc agagagggaa aaacggagag 240
tgaaggagcg aggaggcgag cgtgagagaa aggagagaga gaaaaagaa agggcgaggg 300
gctagtggag gaaggaagga gggggcgctg cgcgaggcgg agagagggcg aagcagtcgc 360
ggcactggcg ctcacattcc tctatgctac aaatccagga ggaagttttt ttttaggggg 420
ctgagatgct ccatgccttt aaaagggcag ccttgacgcg cggccctctc ggcagagact 480
gagcggcgag aaagtgcgag ccgggcccgc agaactctgc tggcgggcgc tggagcctgc 540
gttactcgcg gcccgcagcc gtccggctac tttgcgttg gcccgccag cgcgcgcg 600
cgcgcgcgcg ccattgcctg caggctagga cttcgcgagg tgggtcgact caccctccct 660
ctctctcttc ttctctctct tctctctct cttgttctc ctctctctcc cgattttccc 720
tctctggctg gcgagggtgg gggggcgggg ggaggccggg gctcgccccg agcagccacg 780
atgctcttgg acgcggccc ccagtagcca gcgatcggcg tgaccacctt tggcgctcc 840
cgccaccact ccgcggcgca cgtggccgaa cgagacgtgg gcctgggcat caaccgctc 900
gccgacgcca tgggcgcctt caagctcaac ccagttcgc acgagctggc ttcggccggc 960
cagacagcct tcacgtcgca ggcgcaggc tacgcggctg ctgcggccct gggccatcac 1020
catcaccggg gccacgtcgg ctctattcc agcgcagcct tcaactccac gcgggacttt 1080
ctgttcgca accgggggtt tggcgacgcg gcggcgccag ccagcgcaaca gcacagctc 1140
tttgtgcat cggccggggg cttcgggggc ccacacggcc acacggacgc cgcgggccac 1200
ctctcttcc ccgggttca cgagcaggct gccggccacg cgtcgccata cgtggtcaac 1260
gggcagatga ggctcggctt ctcgggggac atgtacccgc gaccggagca gtacggccag 1320
gtgaccagcc cgcgttcgga gcactatgct gcgccgcagc tgcacggcta cgggccatg 1380
aacgtgaaca tggccgcgca tcacggcgcc ggcgccttct tccgtacat gcgccaacc 1440
atcaagcaag agctcatctg caagtggatc gagcccagc agctggccaa ccccaaaaag 1500
tcgtgcaaca aaactttcag caccatgcac gagctagtta cgcacgtcac cgtggagcac 1560
gtaggtggcc cggagcagag taatcacatc tgcctctggg aggagtgtcc gcgcgagggc 1620
aagcccttca aagccaaata caaactggtt aaccacatcc gcgtgcacac gggcgagaag 1680
ccctttccct cccccttccc tggctgtggc aaggctctcg cgcgtccga gaatttaaag 1740
atccacaaaa ggacgcacac aggggagaag ccttcaagt gcgagtttga gggctgtgac 1800
cggcgcttcg ctaacagcag cgaccgaag aagcacatgc acgtgcacac gagcgacaag 1860
ccctatcttt gcaagatgtg cgacaagtcc tacacgcac cagttccgt gcgcaaacac 1920
atgaaggtec acgaatctc ctcgcagggc tcgcagcctt cgcggccgc cagctctggc 1980
tacgaatcct ccacgcctcc caccatcgtg tctccctcca cagacaacc gaccacaagc 2040
tccttatcgc cctctctc cgcagtcac cacacagcc gccacagtgc gctctcttc 2100
aattttaacg aatggtacgt ttaaatcag aaacaaaca tcgaacaaaa ccctatttaa 2160
gagacttgat cacacacgta tacacaacat tactgaaaga accctgcgaa tcaaaacaac 2220
ccccacacag accccgcaat cctcttttaa aaaatctgcc aatagacca ggacgagtaa 2280
gagaggaagc atcaaccttt taaaaattc ctttcgttt cattattttt ctttttttgg 2340
caaaggcttg gtacccaagg tgcggtaggg ggtcgagggg gaggaggcca cctgacaaa 2400
tgccgccaac cccgagggcc agtttcttgt cgaattggta cgggctctct ggggcttcgg 2460

```

```

cttctttttt tctttgtttt cttgtaaata cagaattatt agcttaaaac tgtactgttg 2520
aatctgttaa atagttatat ctcggttgga gcgggtgggt gggattgttg cgttgtgtgc 2580
tttgcatlgg gggagggggg agggaccgga tgggcggggg gagggggagg gggaggggtg 2640
ggcggccgaa agccaactgt ttgtactgaa tggcaagaat gttctagtaa atgtgtacca 2700
aaatgtgaat tactttgtac gattacagtc tccacgtcga cctaaccгаа tattattggt 2760
attaatgtgc tttttttgta taaagtgcga acatttcgtc ccaaagtcta agtactttag 2820
tgcagtaaaa tgttgtttca tgtcctgtca agaattcgta tagtacgagc ctggatctgc 2880
gtgtcaaaact gttccatttg tttatgtaaa gtgatattaa aaaagatata aactataact 2940
gtccgttact tttggcaaaa gatacaacca cataatgtat ataattccta gtttccatat 3000
ttatccgcat gtaaagggcc ggtttatcca tgttacagct cttcaatatt tatggctaga 3060
agaactcgta tgtacacttt agtttcaga actgtttggt aacctttcgt acctatttaa 3120
agattcttaa atctcaaa 3138

```

<;210>; 6

<;211>; 2623

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;220>;

<;221>; gene

<;222>; (0)... (0)

<;223>; Myelin transcription factor 1 (MyT1) gene Genbank

Accession M96980

<;400>; 6

```

cggaagagtt actacagtaa agatccttca agagctgaga agcgtgagat caagtgtcca 60
acaccaggct gtgatggcac tggccacgtt accgggttgt accctcacca ccgcagcctt 120
tctggctgtc ccacaagga taggatcccc ccagagatct tagccatgca tgagaacgtg 180
ctgaagtgcc cactcctgg ctgcacaggc cagggtcacg tgaacagcaa ccgcaacacg 240
cacagaagtt tgtctgggtg tccattgct gccgccgaaa aattagccaa atcccatgag 300
aagcagcagc cgcagacagg agatccttcc aagagtagct ccaattccga tcggatctc 360
aggccccatg gcttcgtgaa gcagctcgag gtccctccat atgggagcta ccggcccaac 420
gtggccccc gccacacca gggccaactt ggcaaggagc tggagaagtt ctccaaggtc 480
acctttgact acgcaagtgt cgatgctcag gtttttggca aacgcagctt tgccccaaag 540
attcagacca gcgaaacctc acctaaagcc tttcaatcca aacctttccc aaaggcctct 600
tccccaggc acagccctc cagtagttat gtgaggagca cttcatctc tctgcaggc 660
tttgactact cgcaggacgc cgaggctgca cacatggtg ccaactgcat cctgaacctc 720
tccacgcgt gctgggagat gcctgagaac ctcagcacga agccacagga cctccccagc 780
aagtctgtgg atatcgaggt agacgaaaat ggaaccctgg actigagcat gcacaaacac 840
cgcaaacgag aaaatgcttt ccccagcagc agcagctgca gcagcagccc cgggtgtgaag 900
tctcccagc cctcccagc ccacagcagc accagcgccc ccagcagctc catgacctct 960
ccccagtcca gccaggcctc ccgccaggac gagtgggacc ggcccctgga ctaccaaaag 1020
cctagccgcc tgagagagga ggaacctgag gagtcagagc cagcagccca ttcttttgc 1080
tcttctgaag cagatgacca ggaagtgtcg gaagagaatt ttgaggagcg gaagtatccg 1140
ggggaagtca ccctgaccaa ctttaagctg aagtttctct ccaaggacat aaagaaggag 1200
ctgctcacct gtcccacccc tggtgtgtac ggcagcggcc acatcacgg gaactacgcc 1260
tcccaccgca gcctctctgg ttgccctctt gctgacaaga gcctcagaaa cctcatggct 1320
acctactctg ctgacctgaa gtgccccacg cccggctgtg acggctcttg ccacatcaca 1380
gggaactacg cttcacaccg gagcttgtcc ggctgccctc gtgcaaagaa aagtggagtc 1440
aaggtggcac ccaccaagga cgacaaggag gaccccagc tgatgaagtg ccagttcca 1500
ggctgtgtgg ggctcgtca catcagcggg aaatacgct ctcacaggag cgcacccggc 1560
tgcccactgg ccgcccgag gcagaaggaa gggtcctca atggctcgtc attctcctgg 1620
aagtccctga agaataaga cccgacctgc cccaccccg gctgtgacgg ctctggccac 1680

```

```

accattggga gtttctcac ccaccggagt ttgtcaggct gtcccagagc aacctttgct 1740
ggaaagaagg gaaaactgtc aggggatgag gtctcagtc caaagttcaa gactagcgac 1800
gtgttgaga atgatgagga gatcaagcag ctgaaccagg agatccgaga cctgaacgag 1860
tccaactcgg agatggaggc tgccatggtg cagctgcagt cccagatctc ctccatggag 1920
aagaacctga agaacatcga ggaggagaac aagctcattg aggagcagaa tgaagccctg 1980
tttctggagc tgtccggcct gagccaggcc ctcattccaa gtctcgcaa tatccacctt 2040
ccacacatgg agccaatatg cgaacagaat ttctgtccct atgtgagcac cctcaccgac 2100
atgtactcca accaggcccc ggagaacaag gacctcctgg agagcatcaa gcaggtgtg 2160
aggggcatcc aggtctaggc cgtgtgttac ccagaagtgt cccagccac cacaccgttt 2220
acctccctcg cctgccccg caccgtgggg atgcccaact cacagtgact tcccgtttg 2280
ggcccggtgt ggccggggcg ggtttatcca aagggatggc tggaaattgg ccgctccac 2340
gaggtccct ccaggcttgg ccgtggtggc cctatctgtg tgcatagggg cactgaagaa 2400
ttacaaagtg atttattttt gttttctgaa agaaatctga agagcagctc aaagtctcca 2460
gtggaagctc atggacaagg ttctcaggga agttttggag ttgcaacca cagtattcct 2520
ttgtctgtcg aggtggggag ggtagccgtg agcgtgggtg gtgggtgtg tgagtggcat 2580
cttggcctgg agtacacgcc tggggcagcg tgtctgtgct cag 2623

```

```

<;210>; 7
<;211>; 356
<;212>; PRT
<;213>; Homo sapiens
<;220>;
<;221>; PEPTIDE
<;222>; (0)... (0)
<;223>; Neuro D1 protein; Genbank Accession D82347
<;400>; 7

```

```

Met Thr Lys Ser Tyr Ser Glu Ser Gly Leu Met Gly Glu Pro Gln Pro
1          5          10          15
Gln Gly Pro Pro Ser Trp Thr Asp Glu Cys Leu Ser Ser Gln Asp Glu
20          25          30
Glu His Glu Ala Asp Lys Lys Glu Asp Asp Leu Glu Ala Met Asn Ala
35          40          45
Glu Glu Asp Ser Leu Arg Asn Gly Gly Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu
50          55          60
Asp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Gln Lys
65          70          75          80
Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala Arg Leu
85          90          95
Glu Arg Phe Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Asn Ala Arg Glu Arg Asn
100         105         110
Arg Met His Gly Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu Arg Lys Val Val
115         120         125
Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr Leu Arg
130         135         140
Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile Leu Arg Ser Gly
145         150         155         160
Lys Ser Pro Asp Leu Val Ser Phe Val Gln Thr Leu Cys Lys Gly Leu
165         170         175
Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Gly Gly Cys Leu Gln Leu Asn Pro
180         185         190
Arg Thr Phe Leu Pro Glu Gln Asn Gln Asp Met Pro Pro His Leu Pro

```

195	200	205
Thr Ala Ser Ala Ser Phe Pro Val His Pro Tyr Ser Tyr Gln Ser Pro		
210	215	220
Gly Leu Pro Ser Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asp Ser Ser His Val Phe		
225	230	235
His Val Lys Pro Pro Pro His Ala Tyr Ser Ala Ala Leu Glu Pro Phe		
245	250	255
Phe Glu Ser Pro Leu Thr Asp Cys Thr Ser Pro Ser Phe Asp Gly Pro		
260	265	270
Leu Ser Pro Pro Leu Ser Ile Asn Gly Asn Phe Ser Phe Lys His Glu		
275	280	285
Pro Ser Ala Glu Phe Glu Lys Asn Tyr Ala Phe Thr Met His Tyr Pro		
290	295	300
Ala Ala Thr Leu Ala Gly Ala Gln Ser His Gly Ser Ile Phe Ser Gly		
305	310	315
Thr Ala Ala Pro Arg Cys Glu Ile Pro Ile Asp Asn Ile Met Ser Phe		
325	330	335
Asp Ser His Ser His His Glu Arg Val Met Ser Ala Gln Leu Asn Ala		
340	345	350
Ile Phe His Asp		
355		
<;210>; 8		
<;211>; 356		
<;212>; PRT		
<;213>; Homo sapiens		
<;220>;		
<;221>; PEPTIDE		
<;222>; (0)... (0)		
<;223>; Neurogenic basic helix-loop-helix protein (Neurod		
1); Genbank Accession U50822.		
<;400>; 8		
Met Thr Lys Ser Tyr Ser Glu Ser Gly Leu Met Gly Glu Pro Gln Pro		
1	5	10
Gln Gly Pro Pro Ser Trp Thr Asp Glu Cys Leu Ser Ser Gln Asp Glu		
20	25	30
Glu His Glu Ala Asp Lys Lys Glu Asp Asp Leu Glu Ala Met Asn Ala		
35	40	45
Glu Glu Asp Ser Leu Arg Asn Gly Gly Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu		
50	55	60
Asp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Gln Lys		
65	70	75
Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala Arg Leu		
85	90	95
Glu Arg Phe Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Asn Ala Arg Glu Arg Asn		
100	105	110
Arg Met His Gly Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu Arg Lys Val Val		
115	120	125
Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr Leu Arg		
130	135	140
Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile Ser Arg Ser Gly		

145                      150                      155                      160  
 Lys Ser Pro Asp Leu Val Ser Phe Val Gln Thr Leu Cys Lys Gly Leu  
                          165                      170                      175  
 Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu Gln Leu Asn Pro  
                          180                      185                      190  
 Arg Thr Phe Leu Pro Glu Gln Asn Gln Asp Met Pro Pro His Leu Pro  
                          195                      200                      205  
 Thr Ala Ser Ala Ser Phe Pro Val His Pro Tyr Ser Tyr Gln Ser Pro  
                          210                      215                      220  
 Gly Leu Pro Ser Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asp Ser Ser His Val Phe  
 225                      230                      235                      240  
 His Val Lys Pro Pro Pro His Ala Tyr Ser Ala Ala Leu Glu Pro Phe  
                          245                      250                      255  
 Phe Glu Ser Pro Leu Thr Asp Cys Thr Ser Pro Ser Phe Asp Gly Pro  
                          260                      265                      270  
 Leu Ser Pro Pro Leu Ser Ile Asn Gly Asn Phe Ser Phe Lys His Glu  
                          275                      280                      285  
 Pro Ser Ala Glu Phe Glu Lys Asn Tyr Ala Phe Thr Met His Tyr Pro  
                          290                      295                      300  
 Ala Ala Thr Leu Ala Gly Ala Gln Ser His Gly Ser Ile Phe Ser Gly  
 305                      310                      315                      320  
 Thr Ala Ala Pro Arg Cys Glu Ile Pro Ile Asp Asn Ile Met Ser Phe  
                          325                      330                      335  
 Asp Ser His Ser His His Glu Arg Val Met Ser Ala Gln Leu Asn Ala  
                          340                      345                      350  
 Ile Phe His Asp  
                          355

<;210>; 9

<;211>; 382

<;212>; PRT

<;213>; Homo sapiens

<;220>;

<;221>; PEPTIDE

<;222>; (0)... (0)

<;223>; Neurogenic basic helix-loop-helix protein (neuro D2); Genbank Accession U58681.

<;400>; 9

Met Leu Thr Arg Leu Phe Ser Glu Pro Gly Leu Leu Ser Asp Val Pro  
   1                      5                      10                      15  
 Lys Phe Ala Ser Trp Gly Asp Gly Glu Asp Asp Glu Pro Arg Ser Asp  
                          20                      25                      30  
 Lys Gly Asp Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Gly Pro Gly Ala  
                          35                      40                      45  
 Pro Gly Pro Ala Arg Ala Ala Lys Pro Val Pro Leu Arg Gly Glu Glu  
                          50                      55                      60  
 Gly Thr Glu Ala Thr Leu Ala Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu Leu Gly  
 65                      70                      75                      80  
 Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Leu Asp Glu Ala  
                          85                      90                      95  
 Glu Gly Glu Arg Pro Lys Lys Arg Gly Pro Lys Lys Arg Lys Met Thr

100	105	110
Lys Ala Arg Leu Glu Arg Ser Lys	Leu Arg Arg Gln Lys Ala Asn Ala	
115	120	125
Arg Glu Arg Asn Arg Met His Asp	Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu	
130	135	140
Arg Lys Val Val Pro Cys Tyr Ser Lys	Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile	
145	150	155
Glu Thr Leu Arg Leu Ala Lys Asn Tyr	Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile	
165	170	175
Leu Arg Ser Gly Lys Arg Pro Asp	Leu Val Ser Tyr Val Gln Thr Leu	
180	185	190
Cys Lys Gly Leu Ser Gln Pro Thr Thr	Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu	
195	200	205
Gln Leu Asn Ser Arg Asn Phe Leu Thr	Glu Gln Gly Ala Asp Gly Ala	
210	215	220
Gly Arg Phe His Gly Ser Gly Gly Pro	Phe Ala Met His Pro Tyr Pro	
225	230	235
Tyr Pro Cys Ser Arg Leu Ala Gly Ala	Gln Cys Gln Ala Ala Gly Gly	
245	250	255
Leu Gly Gly Gly Ala Ala His Ala Leu	Arg Thr His Gly Tyr Cys Ala	
260	265	270
Ala Tyr Glu Thr Leu Tyr Ala Ala Ala	Gly Gly Gly Gly Ala Ser Pro	
275	280	285
Asp Tyr Asn Ser Ser Glu Tyr Glu Gly	Pro Leu Ser Pro Pro Leu Cys	
290	295	300
Leu Asn Gly Asn Phe Ser Leu Lys Gln	Asp Ser Ser Pro Asp His Glu	
305	310	315
Lys Ser Tyr His Tyr Ser Met His Tyr	Ser Ala Leu Pro Gly Ser Arg	
325	330	335
Pro Thr Gly His Gly Leu Val Phe Gly	Ser Ser Ala Val Arg Gly Gly	
340	345	350
Val His Ser Glu Asn Leu Leu Ser Tyr	Asp Met His Leu His His Asp	
355	360	365
Arg Gly Pro Met Tyr Glu Glu Leu Asn	Ala Phe Phe His Asn	
370	375	380

<;210>; 10

<;211>; 238

<;212>; PRT

<;213>; Homo sapiens

<;220>;

<;221>; PEPTIDE

<;222>; (0)... (0)

<;223>; Achaete scute homologous protein (ASH1); Genbank  
Accession L08424.

<;400>; 10

Met Glu Ser Ser Ala Lys Met Glu Ser Gly Gly Ala Gly Gln Gln Pro
1 5 10 15
Gln Pro Gln Pro Gln Gln Pro Phe Leu Pro Pro Ala Ala Cys Phe Phe
20 25 30
Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln

35	40	45
Ser Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln		
50	55	60
Ala Pro Gln Leu Arg Pro Ala Ala Asp Gly Gln Pro Ser Gly Gly Gly		
65	70	75
His Lys Ser Ala Pro Lys Gln Val Lys Arg Gln Arg Ser Ser Ser Pro		
85	90	95
Glu Leu Met Arg Cys Lys Arg Arg Leu Asn Phe Ser Gly Phe Gly Tyr		
100	105	110
Ser Leu Pro Gln Gln Gln Pro Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg		
115	120	125
Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Ala Thr Leu Arg		
130	135	140
Glu His Val Pro Asn Gly Ala Ala Asn Lys Lys Met Ser Lys Val Glu		
145	150	155
Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Gln Leu Leu		
165	170	175
Asp Glu His Asp Ala Val Ser Ala Ala Phe Gln Ala Gly Val Leu Ser		
180	185	190
Pro Thr Ile Ser Pro Asn Tyr Ser Asn Asp Leu Asn Ser Met Ala Gly		
195	200	205
Ser Pro Val Ser Ser Tyr Ser Ser Asp Glu Gly Ser Tyr Asp Pro Leu		
210	215	220
Ser Pro Glu Glu Gln Glu Leu Leu Asp Phe Thr Asn Trp Phe		
225	230	235

<;210>; 11  
 <;211>; 447  
 <;212>; PRT  
 <;213>; Homo sapiens  
 <;220>;  
 <;221>; PEPTIDE  
 <;222>; (0)... (0)  
 <;223>; Zic 1 protein; Genbank Accession D76435.  
 <;400>; 11

Met Leu Leu Asp Ala Gly Pro Gln Tyr Pro Ala Ile Gly Val Thr Thr		
1	5	10
Phe Gly Ala Ser Arg His His Ser Ala Gly Asp Val Ala Glu Arg Asp		
20	25	30
Val Gly Leu Gly Ile Asn Pro Phe Ala Asp Gly Met Gly Ala Phe Lys		
35	40	45
Leu Asn Pro Ser Ser His Glu Leu Ala Ser Ala Gly Gln Thr Ala Phe		
50	55	60
Thr Ser Gln Ala Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Ala Leu Gly His His		
65	70	75
His His Pro Gly His Val Gly Ser Tyr Ser Ser Ala Ala Phe Asn Ser		
85	90	95
Thr Arg Asp Phe Leu Phe Arg Asn Arg Gly Phe Gly Asp Ala Ala Ala		
100	105	110
Ala Ala Ser Ala Gln His Ser Leu Phe Ala Ala Ser Ala Gly Gly Phe		
115	120	125



Gly Gly Pro His Gly His Thr Asp Ala Ala Gly His Leu Leu Phe Pro  
 130 135 140  
 Gly Leu His Glu Gln Ala Ala Gly His Ala Ser Pro Asn Val Val Asn  
 145 150 155 160  
 Gly Gln Met Arg Leu Gly Phe Ser Gly Asp Met Tyr Pro Arg Pro Glu  
 165 170 175  
 Gln Tyr Gly Gln Val Thr Ser Pro Arg Ser Glu His Tyr Ala Ala Pro  
 180 185 190  
 Gln Leu His Gly Tyr Gly Pro Met Asn Val Asn Met Ala Ala His His  
 195 200 205  
 Gly Ala Gly Ala Phe Phe Arg Tyr Met Arg Gln Pro Ile Lys Gln Glu  
 210 215 220  
 Leu Ile Cys Lys Trp Ile Glu Pro Glu Gln Leu Ala Asn Pro Lys Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Cys Asn Lys Thr Phe Ser Thr Met His Glu Leu Val Thr His Val  
 245 250 255  
 Thr Val Glu His Val Gly Gly Pro Glu Gln Ser Asn His Ile Cys Phe  
 260 265 270  
 Trp Glu Glu Cys Pro Arg Glu Gly Lys Pro Phe Lys Ala Lys Tyr Lys  
 275 280 285  
 Leu Val Asn His Ile Arg Val His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Pro Cys  
 290 295 300  
 Pro Phe Pro Gly Cys Gly Lys Val Phe Ala Arg Ser Glu Asn Leu Lys  
 305 310 315 320  
 Ile His Lys Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Glu Phe  
 325 330 335  
 Glu Gly Cys Asp Arg Arg Phe Ala Asn Ser Ser Asp Arg Lys Lys His  
 340 345 350  
 Met His Val His Thr Ser Asp Lys Pro Tyr Leu Cys Lys Met Cys Asp  
 355 360 365  
 Lys Ser Tyr Thr His Pro Ser Ser Val Arg Lys His Met Lys Val His  
 370 375 380  
 Glu Ser Ser Ser Gln Gly Ser Gln Pro Ser Pro Ala Ala Ser Ser Gly  
 385 390 395 400  
 Tyr Glu Ser Ser Thr Pro Pro Thr Ile Val Ser Pro Ser Thr Asp Asn  
 405 410 415  
 Pro Thr Thr Ser Ser Leu Ser Pro Ser Ser Ser Ala Val His His Thr  
 420 425 430  
 Ala Gly His Ser Ala Leu Ser Ser Asn Phe Asn Glu Trp Tyr Val  
 435 440 445

<;210>; 12

<;211>; 725

<;212>; PRT

<;213>; Homo sapiens

<;220>;

<;221>; PEPTIDE

<;222>; (0)... (0)

<;223>; Myelin transcription factor 1 (My T1); Genbank  
 Accession M96980.

<;400>; 12

Arg	Lys	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Lys	Asp	Pro	Ser	Arg	Ala	Glu	Lys	Arg	Glu
1				5				10						15	
Ile	Lys	Cys	Pro	Thr	Pro	Gly	Cys	Asp	Gly	Thr	Gly	His	Val	Thr	Gly
			20					25					30		
Leu	Tyr	Pro	His	His	Arg	Ser	Leu	Ser	Gly	Cys	Pro	His	Lys	Asp	Arg
		35					40					45			
Ile	Pro	Pro	Glu	Ile	Leu	Ala	Met	His	Glu	Asn	Val	Leu	Lys	Cys	Pro
		50				55					60				
Thr	Pro	Gly	Cys	Thr	Gly	Gln	Gly	His	Val	Asn	Ser	Asn	Arg	Asn	Thr
65					70					75				80	
His	Arg	Ser	Leu	Ser	Gly	Cys	Pro	Ile	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	Leu	Ala
				85					90					95	
Lys	Ser	His	Glu	Lys	Gln	Gln	Pro	Gln	Thr	Gly	Asp	Pro	Ser	Lys	Ser
			100					105					110		
Ser	Ser	Asn	Ser	Asp	Arg	Ile	Leu	Arg	Pro	Met	Cys	Phe	Val	Lys	Gln
		115					120					125			
Leu	Glu	Val	Pro	Pro	Tyr	Gly	Ser	Tyr	Arg	Pro	Asn	Val	Ala	Pro	Arg
		130				135					140				
His	Thr	Gln	Gly	Gln	Leu	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Lys	Phe	Ser	Lys	Val
145					150					155				160	
Thr	Phe	Asp	Tyr	Ala	Ser	Phe	Asp	Ala	Gln	Val	Phe	Gly	Lys	Arg	Met
				165					170					175	
Leu	Ala	Pro	Lys	Ile	Gln	Thr	Ser	Glu	Thr	Ser	Pro	Lys	Ala	Phe	Gln
			180					185				190			
Ser	Lys	Pro	Phe	Pro	Lys	Ala	Ser	Ser	Pro	Arg	His	Ser	Pro	Ser	Ser
		195					200				205				
Ser	Tyr	Val	Arg	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Phe	Asp	Tyr	Ser
		210				215					220				
Gln	Asp	Ala	Glu	Ala	Ala	His	Met	Ala	Ala	Thr	Ala	Ile	Leu	Asn	Leu
225					230					235				240	
Ser	Thr	Arg	Cys	Trp	Glu	Met	Pro	Glu	Asn	Leu	Ser	Thr	Lys	Pro	Gln
			245					250						255	
Asp	Leu	Pro	Ser	Lys	Ser	Val	Asp	Ile	Glu	Val	Asp	Glu	Asn	Gly	Thr
		260						265				270			
Leu	Asp	Leu	Ser	Met	His	Lys	His	Arg	Lys	Arg	Glu	Asn	Ala	Phe	Pro
		275					280					285			
Ser	Ser	Ser	Ser	Cys	Ser	Ser	Ser	Pro	Gly	Val	Lys	Ser	Pro	Asp	Ala
		290				295					300				
Ser	Gln	Arg	His	Ser	Ser	Thr	Ser	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Met	Thr	Ser
305					310					315				320	
Pro	Gln	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	Arg	Gln	Asp	Glu	Trp	Asp	Arg	Pro	Leu
			325					330						335	
Asp	Tyr	Thr	Lys	Pro	Ser	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Glu	Pro	Glu	Glu	Ser
		340					345					350			
Glu	Pro	Ala	Ala	His	Ser	Phe	Ala	Ser	Ser	Glu	Ala	Asp	Asp	Gln	Glu
		355					360					365			
Val	Ser	Glu	Glu	Asn	Phe	Glu	Glu	Arg	Lys	Tyr	Pro	Gly	Glu	Val	Thr
		370					375				380				
Leu	Thr	Asn	Phe	Lys	Leu	Lys	Phe	Leu	Ser	Lys	Asp	Ile	Lys	Lys	Glu
385					390					395				400	

Leu Leu Thr Cys Pro Thr Pro Gly Cys Asp Gly Ser Gly His Ile Thr  
                   405                  410                  415  
 Gly Asn Tyr Ala Ser His Arg Ser Leu Ser Gly Cys Pro Leu Ala Asp  
                   420                  425                  430  
 Lys Ser Leu Arg Asn Leu Met Ala Thr His Ser Ala Asp Leu Lys Cys  
                   435                  440                  445  
 Pro Thr Pro Gly Cys Asp Gly Ser Gly His Ile Thr Gly Asn Tyr Ala  
                   450                  455                  460  
 Ser His Arg Ser Leu Ser Gly Cys Pro Arg Ala Lys Lys Ser Gly Val  
                   465                  470                  475                  480  
 Lys Val Ala Pro Thr Lys Asp Asp Lys Glu Asp Pro Glu Leu Met Lys  
                   485                  490                  495  
 Cys Pro Val Pro Gly Cys Val Gly Leu Gly His Ile Ser Gly Lys Tyr  
                   500                  505                  510  
 Ala Ser His Arg Ser Ala Ser Gly Cys Pro Leu Ala Ala Arg Arg Gln  
                   515                  520                  525  
 Lys Glu Gly Ser Leu Asn Gly Ser Ser Phe Ser Trp Lys Ser Leu Lys  
                   530                  535                  540  
 Asn Glu Asp Pro Thr Cys Pro Thr Pro Gly Cys Asp Gly Ser Gly His  
                   545                  550                  555                  560  
 Thr Ile Gly Ser Phe Leu Thr His Arg Ser Leu Ser Gly Cys Pro Arg  
                   565                  570                  575  
 Ala Thr Phe Ala Gly Lys Lys Gly Lys Leu Ser Gly Asp Glu Val Leu  
                   580                  585                  590  
 Ser Pro Lys Phe Lys Thr Ser Asp Val Leu Glu Asn Asp Glu Glu Ile  
                   595                  600                  605  
 Lys Gln Leu Asn Gln Glu Ile Arg Asp Leu Asn Glu Ser Asn Ser Glu  
                   610                  615                  620  
 Met Glu Ala Ala Met Val Gln Leu Gln Ser Gln Ile Ser Ser Met Glu  
                   625                  630                  635                  640  
 Lys Asn Leu Lys Asn Ile Glu Glu Glu Asn Lys Leu Ile Glu Glu Gln  
                   645                  650                  655  
 Asn Glu Ala Leu Phe Leu Glu Leu Ser Gly Leu Ser Gln Ala Leu Ile  
                   660                  665                  670  
 Gln Ser Leu Ala Asn Ile His Leu Pro His Met Glu Pro Ile Cys Glu  
                   675                  680                  685  
 Gln Asn Phe Val Pro Tyr Val Ser Thr Leu Thr Asp Met Tyr Ser Asn  
                   690                  695                  700  
 Gln Ala Pro Glu Asn Lys Asp Leu Leu Glu Ser Ile Lys Gln Ala Val  
                   705                  710                  715                  720  
 Arg Gly Ile Gln Val  
                   725

<;210>; 13

<;211>; 27

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;220>;

<;221>; gene

<;222>; (0)... (0)

<;223>; MSX1 antisense oligonucleotide sequence MSX1-1

<;400>; 13  
 gacaccgagt ggcaaagaag tcattgtc 27  
 <;210>; 14  
 <;211>; 24  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Homo sapiens  
 <;220>;  
 <;221>; gene  
 <;222>; (0)... (0)  
 <;223>; MSX1 antisense oligonucleotide sequence MSX1-2  
 <;400>; 14  
 cggcttcctg tggctcgcca tgag 24  
 <;210>; 15  
 <;211>; 35  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Homo sapiens  
 <;220>;  
 <;221>; gene  
 <;222>; (0)... (0)  
 <;223>; HES1 open reading frame 5' sequence (HES1-1)  
 <;400>; 15  
 accggggacg aggaattttt ctccattata tcagc 35  
 <;210>; 16  
 <;211>; 40  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Homo sapiens  
 <;220>;  
 <;221>; gene  
 <;222>; (0)... (0)  
 <;223>; HES1 open reading frame middle sequence (HES1-2)  
 <;400>; 16  
 cacggagggtg ccgctgttgc tgggctgggtg tgggttagac 40

【図面の簡単な説明】

【図 1】ニューロン細胞への表皮基底細胞の分化転換。  
 脱分化した表皮基底細胞は、NeuroD1+Zic1  
 +MyT1でトランスフェクションし、同時にMSX1  
 とHES転写因子の一部に対応するアンチセンスオリゴ

スクレオチドで処理した。(A) 表皮基底細胞、(B)  
 脱分化した表皮基底細胞、(C) 新しく創り出したニュー  
 ーロン、細胞の25%は、トランスフェクションおよび  
 BDNFと全-transレチノイン酸による処理の5  
 日後の免疫反応性のニューロフィラメントMである。

【図1】

(A)



(B)



(C)



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/15

Z

G 0 1 N 33/15

33/50

Z

33/50

C 0 7 K 14/52

// C 0 7 K 14/52

C 1 2 P 21/02

K

C 1 2 P 21/02

C 1 2 N 5/00

B

(72) 発明者 トマス ニューマン

アメリカ合衆国 カリフォルニア、サンタ

モニカ、トゥエンティシックス スト

リート 13525、ユニット エイ

1 Title of Invention

TRANSDIFFERENTIATION OF TRANSFECTED EPIDERMAL BASAL CELLS  
INTO NEURAL PROGENITOR CELLS, NEURONAL CELLS AND/OR GLIAL  
CELLS

3 Detailed Description of Invention

BACKGROUND OF THE INVENTION

5 Throughout the application various publications are referenced in parentheses. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference in the application in order to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

1. FIELD OF THE INVENTION

10 The present invention is related to the medical arts, particularly to the field of neural tissue regeneration.

2. DISCUSSION OF THE RELATED ART

15 The human nervous system comprises highly diverse cell types that make specific interconnections with one another. The nervous system includes the peripheral nerves and the central nervous system. The central nervous system includes the brain, cranial nerves, and spinal cord. Once damaged, the central nervous system of the adult has limited potential for structural self-repair. The general inability of the adult to generate new neurons (excitable cells specialized for the transmission of electrical signals from one part of the body to another) typically prevents the regeneration of neural tissues. This limitation has hindered the development of therapies for neurological injury, for example from stroke or physical trauma, or for degenerative diseases, such as Huntington disease, Alzheimer disease, and Parkinsonism. The moderate success of fetal tissue transplantation therapy for Parkinsonism suggest that cell replacement therapy can be a valuable treatment for neurological injury and degeneration.

25 Thus, there is a long felt need in the biomedical field for a method of generating neurons for use in the treatment of various neurological traumas, diseases, disorders, or maladies via the direct transfer of neuronal cells in a cell replacement therapy approach.

30 A gene therapy approach, on the other hand, is required to treat other types of nervous system disorders. Because the brain is protected by a blood-brain barrier that effectively blocks the flow of large molecules into the brain, peripheral injection of growth factor drugs, or other potentially therapeutic gene products, is ineffective. Thus, a major challenge facing

the biotechnology industry is to find an efficient mechanism for delivering gene therapy products, directly to the brain, so as to treat neurological disorders on the molecular level. In this regard, a renewable source of human neural cells could serve as a vehicle to deliver gene therapy products to the brain and the rest of the central nervous system.

5           Until recently, the only source of donor material for these promising therapies was fetal tissue. However, the use of fetal tissue presents significant ethical and technical problems, including the limited availability of fetal tissue, the possible immuno-rejection of donor material by the recipient, and the risk of disease transmission by donor material.

          Several attempts have been made to address the shortage of donor material by  
10   culturing neural progenitor cells, or neural stem cells. For example, Boss *et. al* taught a method for isolation and proliferation of neural progenitor cells directed to growth, storage, production and implantation of the proliferated donor cells. (Boss *et. al*, *Proliferated Neuron Progenitor Cell Product and Process*, U.S. Patent No. 5,411,883). Anderson *et. al* taught a method for isolation and clonal propagation of donor mammalian neural crest stem cells  
15   capable of self renewal and differentiation into neural or glial cells. (Anderson *et. al*, *Mammalian Neural Crest Stem Cells*, U.S. Patent No. 5,589,376). Johe taught a method for isolation, propagation and directed differentiation of stem cells from the central nervous system of embryonic and adult mammalian donors. (Johe, *Isolation Propagation and Directed Differentiation of Stem Cells from Embryonic and Adult Central Nervous System of Mammals*, U.S. Patent No. 5,753,506).  
20

          Neural progenitor cells normally develop from embryonic ectodermal tissue. Bone Morphogenetic Protein (BMP) is a family of repressors that prevents ectoderm from developing into its default state of neural tissue and induces the development instead of epidermal tissue. (Y. Tanabe & T.M. Jessell, *Diversity and Pattern in the Developing Spinal Cord*, Science 274:1115 [1996]; Y. Sasai, *Identifying the missing links: genes that connect neuronal induction and primary neurogenesis in vertebrate embryos*, Neuron 21:455-58 [1998]; Y. Furuta *et al.*, *Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development*, Development 124(11):2203-2212 [1997]). BMP 2 and BMP 4 induce epidermal differentiation. (E. Pera *et al.*, *Ectodermal Patterning in the Avian Embryo: Epidermis Versus Neural Plate*, Development 126:63 [1999]).  
25  
30

          BMP's can also induce cartilage formation. Hattersley *et al.* showed that adding BMP 13 to a cell line derived from mouse limb buds leads to the formation of chondroblast-like cells and taught a method for using BMP 13 to induce articular cartilage formation at the site

of congenital or trauma induced damage and for using BMP 9 to maintain cartilage. (Hattersley *et al.*, *Cartilage Induction by Bone Morphogenetic Proteins*, U.S. Patent No. 5,902,785).

5 BMP signal transduction appears to be mediated by *msx1*, which is an immediate early response gene involved in epidermal induction and inhibition of neuronal differentiation. When Suzuki *et al.* injected BMP RNA into *Xenopus* embryos, they detected *msx1* RNA production; when they injected *msx1* RNA, the embryos lost neuronal structures such as eyes. (Suzuki *et al.*, *Xenopus msx1 Mediates Epidermal Induction and Neural Inhibition by BMP4*, *Development* 124:3037 [1997]). When *msx1* was added directly to dissociated ectodermal  
10 cells, epidermal development was up-regulated and neural development was down-regulated.

Similarly in humans, BMP growth factors induce expression of the homeodomain transcription factor MSX1 in ectodermal cells. Once MSX1 is expressed, induction of the neuronal determination genes is simultaneously suppressed and neuronal differentiation is inhibited.

15 BMP seems to down-regulate neural development through at least two mechanisms: proteolysis of MASH1 protein and inhibition of Zic3 production. Exposure of neural progenitor cells to BMP triggered a rapid loss of MASH1 protein, a transcription factor that is homologous to the *Drosophila* Achaete-Scute Complex (ASH1) and required for the production of olfactory receptor neurons. (Shou *et al.*, *BMPs Inhibit Neurogenesis by a Mechanism Involving Degradation of a Transcription Factor*, *Nat. Neurosci.* 2: 339 [1999]).  
20 Micro-injection of the dominant negative form of the BMP receptor, an inhibitor of BMP, into *Xenopus* embryos induced production of Zic3, a protein that augments neural development. (Nakata *et al.*, *Xenopus Zic3, a Primary Regulator Both in Neural and Neural Crest Development*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 11980 [1997]).

25 Antagonists of BMP signal transduction activity include fetuin glycoprotein, also known as  $\alpha$ 2-HS glycoprotein in humans, and the DAN family of BMP antagonists, such as noggin, chordin, follistatin, and gremlin. (R. Merino *et al.*, *The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb*, *Development* 126(23):5515-22 [1999]; D. Sela-Donnenfeld and C. Kalcheim, *Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and noggin in the dorsal neural tube*, *Development* 126(21):4749-62 [1999]). For example, Demetriou *et al.* showed that fetuin blocks osteogenesis, a function promoted by BMP, in a culture of rat bone marrow  
30 cells and that a fetuin derived peptide binds BMP 2. (M. Demetriou *et al.*, *Fetuin/Alpha2-HS*



*Glycoprotein is a Transforming Growth Factor-Beta Type II Receptor Mimic and Cytokine Antagonist*, J. Biol. Chem. 271:12755-61 [1996]). During embryonic and early postnatal development, Fetuin was shown to be present in a sub-population of cells in the retinal ganglion cell layer, the neuroblastic layer, and portions of the developing cerebellum. (Kitchener *et al.*, *Fetuin in Neurons of the Retina and Cerebellum During Fetal and Postnatal Development of the Rat*, Int. J. Dev. Neurosci. 17: 21 [1999]).

Fetuin has been used as an additive in serum free media. Ham *et al.* taught the use of fetuin as an additive in serum free media for the growth of normal human muscle satellite cells directed at transplantation to the muscles of patients afflicted with muscle degenerative diseases. (Ham *et al.*, *Media for Normal Human Muscle Satellite Cells*, U.S. Patent No. 5,143,842; Ham *et al.*, *Media for Normal Human Muscle Satellite Cells*, U.S. Patent No. 5,324,656). Baker taught the use of fetuin as an additive in a defined serum free media that is capable of growing a wide range of cell suspensions and monolayers. (Baker, *Serum-Free Cell Culture Medium and Process for Making Same*, U.S. Patent No. 4,560,655).

Other factors beside BMP appear to be involved in regulating neural differentiation. Ishibashi *et al.* demonstrated that persistent expression of Hairy and Enhancer of Split Homolog-1 (HES1) severely perturbs neuronal and glial differentiation. They infected the lateral ventricles of the brains of embryonic mice with a retrovirus that produced HES1. This led to failed migration and differentiation in the developing cells that were infected. (Ishibashi *et al.*, *Persistent Expression of Helix-Loop-Helix Factor HES-1 Prevents Mammalian Neural Differentiation in the Central Nervous System*, The EMBO Journal 13: 1799 [1994]). Ishibashi *et al.* also disrupted the HES1 gene in mice and observed earlier than usual neurogenesis. They concluded that HES1 controls the timing of neurogenesis. (Ishibashi *et al.*, *Targeted Disruption of Mammalian Hairy and Enhancer of Split Homolog-1 (HES-1) Leads to Up-Regulation of Neural Helix-Loop-Helix Factors, Premature Neurogenesis, and Severe Neural Tube Defects*, Genes & Development 9: 3136 [1995]). In addition retinoids, such as retinoic acid, may play a role in inducing the differentiation of some neural cell populations. (e.g., Y. Renoncourt *et al.*, *Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons*, Mechanisms of Development 79:185-97 [1998]).

Thus, the differentiation of neuronal tissue involves the interaction of numerous positive and negative regulatory molecules. In response to developmental signals within each cell and its surrounding microenvironment, every neuronal population expresses a

specific set of neural markers, neurotransmitters, and receptors. As neural progenitor cells differentiate into other neuronal cell types in response to physiological signals in the microenvironment, the set that is expressed will be different. (E.g., see D.L. Stemple and N.K. Mahanthappa, *Neural stem cells are blasting off*, *Neuron* 18:1-4 [1997]; Y. Renoncourt *et al.*, *Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons*, *Mechanisms of Development* 79:185-97 [1998]; A.J. Kalyani *et al.*, *Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture*, *J. Neurosci.* 18(19):7856-68 [1998]). Each neuronal cell type is characterized by several criteria including morphology (e.g., long processes or neurites), expression of a set of neural-specific markers (e.g., neurofilament M, neural-specific tubulin, neural-specific enolase, microtubule associated protein 2, and others), synthesis of neurotransmitters (e.g., dopamine or expression of tyrosine hydroxylase, the key enzyme in dopamine synthesis), and membrane excitability.

One of the central principles of modern neurobiology is that after differentiation each of the major projection neurons, if not all neuronal cell types, requires for its survival specific cytokines, i.e., neurotrophic or nerve growth factors, to reach their target neuronal cells. Neuropathies in many diseases may be caused by, or involve lack of, such nerve growth factors. These nerve growth factors represent the next generation of preventative and therapeutic drugs for nervous system disorders. Most of the growth factors known so far in the nervous system were discovered by their effects on peripheral nerves and these most likely represent a very minor fraction of existing growth factors in the brain. Search for growth factors from the brain has been difficult mainly because particular neuronal cell types are difficult to isolate from the brain and maintain in defined culture conditions.

Due to this limitation, drug discovery by traditional pharmacology directed to the central nervous system has been performed using whole brain homogenate and animals. These studies mostly produced analogs of neurotransmitters with broad actions and side effects. But as more and more neurotransmitter receptors and signal transducing proteins have been identified from the brain, it is becoming clear that the dogma of one neurotransmitter activating one receptor is an over-simplification. Most receptor complexes in neurons are composed of protein subunits encoded by several genes and each gene synthesizes many different variations of the protein. These variations result in a wide range of possible receptor combinations, and not a single receptor that can interact with a neurotransmitter. Consequently, a range of signal output may be produced by a single neurotransmitter action.

The specific signal effected by a neurotransmitter on a neuron, then, depends on which receptor complex is produced by the cell. Thus, cellular diversity must parallel the molecular diversity and constitute a major structural element underlying the complexity of brain function, and a source of diverse neuronal cell types that can be cultured for drug screening purposes is needed.

Therefore, there remains a need in the field of neurological research and applied neurobiology for a renewable non-fetal source of neural progenitor cells and cells having characteristics specifically associated with neuronal or glial cell types, for use in research, cell therapy, or gene therapy. Importantly, the use of such cells could eliminate a need for fetal human tissue in therapeutic approaches aimed at restoring neurological function by intracerebral transplantation of nervous system cells. These and other benefits the present invention provides as described herein.

### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a method of transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor cell, a neuronal cell, or a glial cell. The method involves culturing a proliferating epidermal basal cell population comprising one or more epidermal basal cell(s) derived from the skin of a mammalian subject. These epidermal basal cell(s) are transfected, in vitro, with one or more eukaryotic expression vector(s) that contain at least one cDNA encoding a human neurogenic transcription factor, or homologous non-human counterpart, or active fragment(s) thereof, such as NeuroD1, NeuroD2,  $\Delta$ ASH1, Zic1, Zic3, or MyT1, such that at least one of the neurogenic transcription factor(s) is expressed in the cell. The transfected cell(s) are grown in an in vitro growth medium in which is present at least one antisense oligonucleotide comprising a segment of a human MSX1 gene and/or human HES1 gene, or homologous non-human counterpart of either of these, thereby suppressing at least one negative regulator of neuronal differentiation; and the cell(s) are, optionally, further grown with a retinoid and at least one neurotrophin, such as BDNF, CNTF, PDGF, NGF, NT-3, NT-4, or sonic hedgehog, or a cytokine comprising IL-6. By the inventive method the cell(s) is transdifferentiated into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell.

The present invention also relates to a transdifferentiated cell(s) of epidermal origin. The inventive transdifferentiated cell is a cell of epidermal basal cell origin that displays one

or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell. The physiological and/or immunological feature can be, but is not limited to, expression of one or more marker(s) specific to a neural progenitor, neuronal, or glial cell, by which the transdifferentiated cell is recognized as a neural progenitor, neuronal or neuron-like cell, or a glial or glial-like cell.

The present invention also relates to cell cultures derived from the inventive transdifferentiated cell(s).

The present invention is also directed to a method of delivering locally secretable regulatory factors using the inventive transdifferentiated cells, which are genetically modified, before or after their transdifferentiation, with an expression vector comprising a DNA encoding a preselected secretable regulatory factor or a biochemical precursor thereof, or a DNA encoding an enzyme that catalyzes the synthesis of either of these. The genetically modified, transdifferentiated cells are implanted into a mammalian subject, and the implanted cells secrete the locally secretable regulatory factor.

The present invention also relates to method of using the inventive transdifferentiated cell(s) to identify a novel nerve growth factor or potential chemotherapeutic agent. The methods involve transdifferentiating a population of proliferating epidermal basal cells into neuronal progenitor cells, neuronal cells, or glial cells; culturing the transdifferentiated cells; exposing the cultured cells, in vitro, to a potential nerve growth factor (i.e., neurotrophin or neurotrophic factor) and/or potential chemotherapeutic agent; and detecting the presence or absence of an effect of the potential nerve growth factor and/or potential chemotherapeutic agent on the survival of the cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of the cells. The presence of an effect altering cell survival, a morphological or electrophysiological characteristic and/or a molecular biological property of the cells indicates the activity of the potential nerve growth factor and/or potential chemotherapeutic agent.

The present invention also relates to a method of using the inventive transdifferentiated cell(s) to screen a potential chemotherapeutic agent to treat a nervous system disorder of genetic origin. In the method the epidermal basal cells are derived from a human subject having a particular nervous system disorder of genetic origin. The cells are transdifferentiated in accordance with the inventive method. The transdifferentiated cells are cultured and exposed, in vitro, to a potential chemotherapeutic agent. The method involves detecting the presence or absence of an effect of the potential chemotherapeutic agent on the survival of the

cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of said cells. An effect altering cell survival, a morphological or electrophysiological characteristic and/or a molecular biological property of the cells indicates the activity of the chemotherapeutic agent.

5        The present invention is also related to a kit for transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell. The kit is useful for practicing the inventive methods.

10        The present invention is directed to methods of converting, or transdifferentiating, epidermal cells into different types of neural cells having numerous uses in the field of applied neurobiology. In particular, the newly created neurons of the invention can be used in both cell therapies and gene therapies aimed at alleviating neurological disorders and diseases. Further, the invention obviates the need for human fetal tissue as a renewable source of neurons to be used in various medical and research applications.

15        These and other advantages and features of the present invention will be described more fully in a detailed description of the preferred embodiments which follows.

#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

20        Figure 1. Transdifferentiation of epidermal basal cells into neuronal cells. Dedifferentiated epidermal basal cells were transfected with NeuroD1+Zic1+MyT1 and simultaneously treated with antisense oligonucleotides corresponding to a portion of MSX1 and HES transcription factors. (A) epidermal basal cells, (B) dedifferentiated epidermal basal cells, (C) newly created neurons, 25% of cells are Neurofilament M immunoreactive 5 days after transfection and treatment with BDNF and all-trans retinoic acid.

#### **DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION**

25        An awareness of the difficulties currently associated with neuronal cell or gene therapy approaches, as these pertain to the use of alternative sources of neuronal cells, especially those used for autologous transplantation, has led to the present invention. The present invention provides methods to convert, or transdifferentiate, epidermal cells into different types of neuronal cells that can be used for intracerebral transplantation. Importantly, the present

30

invention also allows for genetic manipulation of the newly created neurons.

A significant aspect of the present invention is that it permits the use of a patient's own cells to develop different types of neuronal cells that can be transplanted after *in vitro* growth and transdifferentiation. Thus, this technology eliminates the problems associated with  
5 transplantation of non-host cells, such as, immunological rejection and the risk of transmitting disease.

The present invention can be used to generate neurons from an individual patient, thus making autologous transplantations possible as a treatment modality for many neurological conditions including neurotrauma, stroke, neurodegenerative diseases such as Parkinson's  
10 disease, Huntington disease, Alzheimer's diseases. Thus, the invention provides for neurological therapies to treat the disease or trauma of interest.

To summarize, this technology provides a plentiful source of neurons for clinical treatments which require transplantation of neurons 1) to compensate for a loss of host neurons, or 2) as vehicles to deliver genetically-based drugs. Further, the invention provides  
15 a novel neurological tool for use in basic research and drug screening.

The theoretical molecular basis of the present invention exploits the orchestrated actions in neuronal development of numerous molecular processes including epigenetic signaling and activation of specific transcription factor systems. During development, ectodermal cells develop into neuronal tissue or epidermis, depending on the signals they  
20 receive from the surrounding cells. At this early developmental stage, activation of various members of the bone morphogenetic protein family (BMP) of growth factors results in epidermal differentiation, while blocking their action results in neuronal differentiation. (See Tanabe and Jessel, 1996, for a review.) This differentiation pathway is due to the action of BMP growth factors which induce expression of the homeodomain transcription factor MSX1  
25 in ectodermal cells. Once MSX1 is expressed, induction of the neuronal determination genes is simultaneously suppressed and neuronal differentiation is inhibited. (Suzuki et al., 1997).

Alternatively, retinoic acid and Sonic Hedgehog (Shh) signaling are responsible for the induction of expression of several neuronal determination and differentiation genes whose activity is essential for neuronal differentiation. (See Tanabe and Jessel, 1996, for a review.)  
30 In particular, data demonstrate that over-expression of several neurogenic basic Helix-Loop-Helix (bHLH) and Zinc-finger transcription factors results in conversion of non-determined ectoderm into neuronal tissue. Additionally, forced expression of bHLH transcription factors, NeuroD1, NeuroD2 (Lee, J.E., Hollenberg, S.M., Snider, L., Turner,

D.L., Lipnick, N. and Weintraub, H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by neuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844; McCormick, M.B., Tamimi, R.M., Snider, L., Asakura, A., Bergstrom, D. and Tapscott, S.J. (1996). NeuroD2 and NeuroD3: distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the neuroD gene family. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5792-5800), or neurogenin 1 (Ma, Q., Kintner, C. and Anderson, D.J. (1996). Identification of neurogenein, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52; McCormick et al., 1996), or Zinc-finger transcription factors MyT1 (Bellefroid, E.J., Bourguignon, C., Hollemann, T., Ma, Q., Anderson, D.J., Kintner, C. and Pieler, T. 1996. X-MyT1, a *Xenopus* C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell* 87, 1191-1202.) or Zic3 (Nakata et al., 1997) results in induction of additional neurogenic transcription factors and initiation of neuronal differentiation of amphibian ectodermal cells.

Moreover, at the level of gene regulation, the effect of neurogenic bHLH transcription factors is antagonized by the HES family of transcription factors which are known to suppress transcription. Over-expression of HES1 protein in developing neuronal cells blocks neuronal differentiation (Ishibashi et al., 1994), whereas blocking its expression stimulates neuronal differentiation (Ishibashi et al., 1995). Thus, neuronal differentiation, like other biological process, is regulated by both positive and negative factors.

The molecular regulatory mechanisms known to be operational during amphibian development were used as the theoretical basis for the present invention. The methods and cell products of the invention are based on the discovery that induced expression of a transcription factor that positively regulates human neuronal differentiation, performed in concert with the suppression of a negative regulator of human neuronal differentiation, results in the conversion of epidermal cells into newly created neurons.

The inventive method, which exploits these molecular mechanisms, results in epidermal basal cells being transdifferentiated into cells having one or more morphological, physiological and/or immunological features of a neural progenitor, neuronal or glial cell. Morphological features include, for example, neurite-like process(es) at least about 50 micrometers in length, characteristic of neuronal cells. Physiological and/or immunological features include expression of one or more specific markers and/or characteristic physiological responses to neural growth factors and other cytokines. Electrochemical characteristics of the cells, or particularly the cell membranes, are also included among physiological features, as are production and secretion by the transdifferentiated cells of regulatory factors such as

dopamine or  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), characteristic of various neuronal cell types.

In accordance with the inventive method, a proliferating epidermal basal cell population is cultured. Thus, the method of transdifferentiating or converting epidermal basal cells into newly created neural progenitors, neurons, and glial cells begins with obtaining  
5 epidermal cells from a mammalian subject's (e.g., a human patient's) skin. The cells of the proliferating epidermal basal cell population are derived from any mammalian subject, including a human subject. The cell(s) can be derived directly from a tissue sample resulting from a surgical procedure such as a skin biopsy of the subject, or can be derived indirectly from cultured or stored epidermal basal cells of the subject.

10 Epidermal basal cells in a skin tissue sample or in a cultured mixed population of basal and keratinized non-basal epidermal cells, are preferably separated from the terminally differentiated keratinized epidermal cells by exposing the mixed cell population to a calcium-free growth medium. For purposes of the present invention, a calcium-free medium contains less than  $10^{-6}$  M calcium cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Low calcium cation concentration results in the  
15 stripping of the keratin-forming upper epidermal layers from the basal cells. (E.g., P.K. Jensen and L. Bolund, *Low  $\text{Ca}^{2+}$  stripping of differentiating cell layers in human epidermal cultures: an invitro model of epidermal regeneration*, Experimental Cell Research 175:63-73 [1988]). The basal cells are then physically separated, selected or isolated from the keratinized cells by any convenient method, such as aspiration or decantation. Calcium  
20 cations are required to support development of keratinocytes (skin cells) from basal cells, and returning calcium to the growth medium results in rapid basal cell proliferation in the dedifferentiated cell population (Jensen and Bolund [1988]), and, thus, a proliferating epidermal basal cell population is cultured. Beyond this, it is not necessary to do a dedifferentiating step with respect to individual epidermal basal cell(s) after they are  
25 separated, isolated, or selected from the differentiated keratinized cells.

In proliferating cell types other than epidermal basal cell, however, calcium may not be necessary to support development of any particular developmental pathway that is being deregulated. Other means to achieve the desired end of dedifferentiation involve treating the  
cells with specific growth factor or cytokines. Also, altering the specific gene expression  
30 pathway that is responsible for differentiation of epidermal cells by genetic manipulation may be used instead of eliminating calcium in the growth media. Moreover, elimination of calcium may not be required if other than proliferating epidermal basal cells are used.

Transfecting or otherwise genetically modifying the epidermal basal cells is then done



in vitro with one or more expression vector(s) containing at least one cDNA encoding a neurogenic transcription factor responsible for neural differentiation. Suitable cDNAs include the basic-helix-loop-helix activators, such as NeuroD1, NeuroD2, ASH1, and zinc-finger type activators, such as Zic3, and MyT1, or other cDNAs including bHLH and/or Zn-finger neurogenic genes. The transcription factors are preferably of human origin, but homologous, non-human counterparts can also be utilized in the invention. Sequences of such non-human counterparts of NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, and MyT1 are available from, for example, the GenBank database of NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The neurogenic transcription factor gene(s) is operatively linked to a promoter of the expression vector, i.e., a transcriptional unit is formed from which the gene is transcribed, producing mRNA from which gene product is translated in the cell after gene delivery. Therefore, in accordance with the inventive method, expression of the neurogenic transcription factor(s) is preferably controlled by a constitutively expressed eukaryotic promoter, such as a cytomegalovirus (CMV) promoter.

Gene delivery to the cell is by any suitable in vitro gene delivery method. (E.g., D.T. Curiel *et al.*, U.S. Patent Nos. 5,521,291 and 5,547,932). Typically, gene delivery involves exposing a cell to a gene delivery mixture that includes preselected genetic material together with an appropriate vector, mixed, for example, with an effective amount of lipid transfecting agent (lipofection). The amount of each component of the mixture is chosen so that gene delivery to a specific species of cell is optimized. Such optimization requires no more than routine experimentation. The ratio of DNA to lipid is broad, preferably about 1:1, although other proportions may also be utilized depending on the type of lipid agent and the DNA utilized. This proportion is not crucial. Other well known gene delivery methods include electroporation or chemical methods. (E.g., M. Ostresh, *No barriers to entry: transfection tools get biomolecules in the door*, The Scientist 13(11):21-23 [1999]).

"Gene delivery agent", as used herein, means a composition of matter added to the genetic material for enhancing the uptake of exogenous DNA segment(s) into a mammalian cell. The enhancement is measured relative to the uptake in the absence of the gene delivery agent. Examples of gene delivery agents include adenovirus-transferrin-polylysine-DNA complexes. These complexes generally augment the uptake of DNA into the cell and reduce its breakdown during its passage through the cytoplasm to the nucleus of the cell.

An immunoliposome transfection method is a preferred means of gene delivery. Other preferred methods also yield high transfection efficiency, such as Ca-coprecipitation, or

transfection using gene delivery agents such as Lipofectamine (Life Technologies), or Fugene-6 (Boehringer Mannheim, Inc.). Other preferred gene delivery agents include Lipofectin<sup>®</sup>, DMRJE C, Cellfectin<sup>®</sup> (Life Technologies), LipoTAXI (Stratagene), Superfect or Effectene (Qiagen). Although these are not as efficient gene delivery agents as viral agents, they have the advantage that they facilitate stable integration of xenogeneic DNA sequence into the vertebrate genome, without size restrictions commonly associated with virus-derived gene delivery agents. But a virus, or transfecting fragment thereof, can be used to facilitate the delivery of the genetic material into the cell. Examples of suitable viruses include adenoviruses, adeno-associated viruses, retroviruses such as human immune-deficiency virus, other lentiviruses, such as Moloney murine leukemia virus and the retrovirus vector derived from Moloney virus called vesicular-stomatitis-virus-glycoprotein (VSV-G)-Moloney murine leukemia virus, mumps virus, and transfecting fragments of any of these viruses, and other viral DNA segments that facilitate the uptake of the desired DNA segment by, and release into, the cytoplasm of cells and mixtures thereof. All of the above viruses may require modification to render them non-pathogenic or less antigenic. Other known viral vector systems are also useful.

The transfection step is followed by expressing, or over-expressing, at least one of the neurogenic transcription factors, while simultaneously, or near simultaneously, deactivating factors that are responsible for suppressing neuronal differentiation. This latter step is accomplished by adding to the growth medium at least one antisense oligonucleotide known to suppress neuronal differentiation, such as the human MSX1 gene and/or the human HES1 gene (or non-human, homologous counterparts), and growing the cells.

Thus, the transfected epidermal basal cell(s) are grown in the presence of at least one antisense oligonucleotide comprising a nucleotide sequence of a segment of a human MSX1 gene and/or a nucleotide sequence of a segment of a human HES1 gene, or homologous non-human counterpart of either of these, in an amount sufficient to suppress the expression of functional gene product of MSX1 or HES1. A sufficient amount of antisense oligonucleotides directed to suppressing transcription of both MSX1 and HES1 is a concentration in the medium of about 5 to 10  $\mu$ M each. Examples of useful antisense oligonucleotide sequences include the following human MSX1 antisense oligonucleotide sequences:

5'-GACACCGAGTGGCAAAGAAGTCATGTC-3' (first methionine) (MSX1-1; SEQ. ID. NO.:13) or

5'-CGGCTTCCTGTGGTCGGCCATGAG-3' (third methionine) (MSX1-2; SEQ. ID. NO.:14); and two antisense oligonucleotides corresponding to the human HES1 open reading frame 5' sequence:

5'-ACCGGGGACGAGGAATTTTCTCCATTATATCAGC-3' (HES1-1; SEQ. ID. NO.:15)

5 or HES1 open reading frame middle sequence 2:

5'-CACGGAGGTGCCGCTGTTGCTGGGCTGGTGTGGTGTAGAC-3' (HES1-2; SEQ. ID. NO.:16).

Other oligonucleotide sequences are also useful as long as they will hybridize to nucleic acids comprising at least a segment of a human or homologous non-human MSX1 gene (e.g., GenBank Accession Nos. M97676 [human]; NM 002448 [human]; X62097 [chicken]; D82577.1 [*Ambystoma mexicanum*]) or at least a segment of an HES1 gene (e.g., GenBank Accession Nos. Y07572 [human]; Q04666 [rat]; P35428 [mouse]; AB019516 [newt]; AB016222 [*Saccharomyces pombe*]; U03914 [*Saccharomyces cerevisiae*]), preventing expression of functional MSX1 and/or HES1 gene products by targeting (i.e., hybridizing with) MSX1 or HES1 nucleic acids. The skilled artisan can readily find other useful MSX1 and /or HES1 oligonucleotide sequences by conducting a sequence similarity search of a genomics data base, such as the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using a computerized algorithm, such as PowerBLAST, QBLAST, PSI-BLAST, PHI-BLAST, gapped or ungapped BLAST, or the "Align" program through the Baylor College of Medicine server. (E.g., Altchul, S.F., *et al.*, *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-402 [1997]; Zhang, J., & Madden, T.L., *PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation*, Genome Res. 7(6):649-56 [1997]; Madden, T.L., *et al.*, *Applications of network BLAST server*, Methods Enzymol. 266:131-41 [1996]; Altschul, S.F., *et al.*, *Basic local alignment search tool*, J. Mol. Biol. 215(3):403-10 [1990]).

Preferably, one or more nucleotide residues of the antisense oligonucleotides is thio-modified by known synthetic methods, used by the practitioner or by a commercial or other supplier, to increase the stability of the oligonucleotides in the culture media and in the cells. (E.g., L. Bellon *et al.*, *4'-Thio-oligo-beta-D-ribonucleotides: synthesis of beta-4'-thio-oligouridylates, nuclease resistance, base pairing properties, and interaction with HIV-1 reverse transcriptase*, Nucleic Acids Res. 21(7):1587-93 [1993]; C. Leydier *et al.*, *4'-Thio-RNA: synthesis of mixed base 4'-thio-oligoribonucleotides, nuclease resistance, and base pairing properties with complementary single and double strand*, Antisense Res. Dev.

5(3):167-74 [1995]).

During the growing of the transfected cells, exposure to the antisense oligonucleotides is for a period long enough for MSX1 and/or HES1 proteins pre-existing in the growing cells to be degraded. For particular proteins with a relatively short half-life, the exposure period necessary is only a matter of hours to one day. Proteins with relatively long half-life require longer treatments with antisense oligonucleotides. An exposure period of about two to three days generally suffices. The further course of development of the transdifferentiated cells depends on the in situ environmental cues to which they are exposed, whether in vitro, or implanted in vivo. Optionally, the transdifferentiated cell(s) are grown in a medium including a retinoid compound, such as retinoic acid or Vitamin A, and optionally a nerve growth factor or neurotrophin, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), platelet-derived growth factor (PDGF), nerve growth factor (NGF), neurotrophin (NT)-3, neurotrophin (NT)-4, or sonic hedgehog (Shh), and/or functional fragments of any of these. For example, treating newly formed neuronal cells with all-trans retinoic acid and BDNF results in development of GABAergic neurons or neuron-like cells (that express Neurofilament M), whereas treatment with glial-conditioned media and sonic hedgehog aminoterminal peptide (Shh-N) results in development of mostly dopaminergic neuronal cells. Treatment with Shh-N promotes the differentiation of neuronal and oligodendroglial species from nestin-immunoreactive cells (uncommitted neural progenitor cells) and inhibits the antiproliferative, astroglial-inductive, oligodendroglial-suppressive effects of BMP2. (E.g., G. Zhu *et al.*, *Sonic hedgehog and BMP2 exert opposing actions on proliferation and differentiation of embryonic neural progenitor cells*, Dev. Biol. 21591):118-29 [1999]). This plasticity in response to the environmental cues allows the cells to maintain neuronal differentiation in vitro or in situ, when implanted into the mammalian subject, without the further addition of antisense oligonucleotides.

In accordance with the method, expression of any neural progenitor-specific, neural-specific, and/or glial specific marker is detected by conventional biochemical or immunochemical means. Preferably, immunochemical means are employed, such as, but not limited to, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescent assay (IFA), immunoelectrophoresis, immunochromatographic assay or immunohistochemical staining. These methods employ marker-specific polyclonal or monoclonal antibodies or antibody fragments, for example Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, or F(v) fragments, that selectively bind any of various neural progenitor, neuronal or glial cell antigens. Antibodies targeting individual

specific markers are commercially available and are conveniently used as recommended by the antibody manufacturers. Markers specific to neural progenitor, neuronal, or glial cells include antigenic molecules that indicate expression of, for example, nestin, neural RNA-binding protein Musashi, neurofilament M (NF-M; Sigma, Inc.), neural-specific tubulin  
5 (Sigma, Inc.), neural-specific enolase (Incstar, Inc.), microtubule associated protein 2 (MAP2, Boehringer Mannheim), glial fibrillary acidic protein, O4, or any other detectable marker specific to a neural progenitor, neuronal or glial cell.

Alternatively, expression of neural progenitor-specific, neural-specific or glial-specific markers is detected by conventional molecular biological techniques for amplifying and  
10 analyzing mRNA transcripts encoding any of the markers, such as but not limited to reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction (RT-PCR), transcription-mediated amplification (TMA), reverse transcriptase-mediated ligase chain reaction (RT-LCR), or hybridization analysis. Nucleic acid sequences encoding markers (e.g., nestin, neural RNA-binding protein Musashi, neurofilament M, neural-specific tubulin, neural-specific enolase,  
15 microtubule associated protein 2, glial fibrillary acidic protein, O4) specific to neural progenitor, neuronal or glial cells are known and available in databases such as GenBank. The skilled artisan can readily determine other useful marker-specific sequences for use as primers or probes by conducting a sequence similarity search of a genomics data base, such as the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using  
20 a computerized algorithm, such as PowerBLAST, QBLAST, PSI-BLAST, PHI-BLAST, gapped or ungapped BLAST, or the "Align" program through the Baylor College of Medicine server. (E.g., Altschul, S.F., *et al.*, *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-402 [1997]; Zhang, J., & Madden, T.L., *PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or  
25 automated sequence analysis and annotation*, Genome Res. 7(6):649-56 [1997]; Madden, T.L., *et al.*, *Applications of network BLAST server*, Methods Enzymol. 266:131-41 [1996]; Altschul, S.F., *et al.*, *Basic local alignment search tool*, J. Mol. Biol. 215(3):403-10 [1990]).

Optionally, morphological criteria are additionally used to detect transdifferentiation of epidermal basal cells into neurons or neuron-like cells. For example, neurons or neuron-like  
30 cells may express neurites, or neurite-like processes, longer than three cell diameters (about 50 microns or longer).

The present invention also relates to a transdifferentiated cell of epidermal origin having a morphological, physiological and/or immunological feature of a neural progenitor, neuronal,

or glial cell. The inventive cell can be, but is not necessarily, produced by the inventive method of transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological features of a neural progenitor, neuronal, or glial cell (astrocyte, oligodendrocyte, or microglia). The cell includes cultured cellular progeny of a cell transdifferentiated from an epidermal basal cell.

“Neural progenitor” is an ectodermally-derived pluripotent stem cell having, as a physiological feature, a capacity, under physiological conditions that favor differentiation (e.g., presence of particular neurotrophic factors), to develop one or more morphological, physiological and/or immunological features specifically associated with a neuronal or glial cell type, i.e., neurons, astrocytes (i.e., astroglia), oligodendrocytes (i.e., oligodendroglia), and microglia. For example, bipotent neural progenitor cells differentiate into astrocytes after exposure to ciliary neurotrophic factor (CNTF), or into neuronal cells after exposure to platelet-derived growth factor (PDGF). (E.g., J.K. Park *et al.*, *Bipotent cortical progenitor cells process conflicting cues for neurons and glia in a hierarchical manner*, J. Neurosci. 19(23):10383-89 [1999]). Some neural progenitors are “neural restricted” progenitors, which can differentiate only into neurons.

The presence of neural progenitors can be detected by functional testing under suitable physiological conditions to determine the course of development and differentiation into neuronal or glial cells. Preferably, neural progenitor cells are identified by detecting the expression of any of several well-defined specific markers, such as the cytoskeletal protein nestin and/or neural RNA-binding protein Musashi (MSI). (E.g., T. Nagata *et al.*, *Structure, backbone dynamics and interactions with RNA of the C-terminal RNA-binding domain of a mouse neural RNA-binding protein, Musashi1*, J. Mol. Biol. 287(2):315-30 [1999]; P. Good *et al.*, *The human Musashi homolog 1 (MSI1) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells*, Genomics 52(3):382-84 [1998]; S. Sakakibara *et al.*, *Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell*, Dev. Biol. 176(2):230-42 [1996]).

“Neuronal” cells, or “neuron-like” cells, include cells that display one or more neural-specific morphological, physiological and/or immunological features associated with a neuronal cell type, including sensory neuronal, motoneuronal, or interneuronal cell types. The practitioner can choose, in connection with a particular application, the operative criteria or subset of specific features used for determining whether a transdifferentiated cell belongs to

a particular type of neuronal population. Useful criterial features include morphological features (e.g., long processes or neurites); physiological and/or immunological features, such as expression of a set of neural-specific markers or antigens (e.g., neurofilament M, neural-specific  $\beta$ -tubulin, neural-specific enolase, microtubule associated protein 2, or others);  
5 synthesis of neurotransmitter(s) (e.g., dopamine; expression of tyrosine hydroxylase— the key enzyme in dopamine synthesis; or gamma aminobutyric acid [GABA]); the presence of receptors for neurotransmitter(s); and/or physiological features such as membrane excitability and/or developmental response to particular cytokines or growth factors. An advantage of the transdifferentiated cell(s) of the invention is that it can be manipulated, in vitro in the  
10 presence of specific exogenously supplied signal molecules, or in vivo within specific microenvironments, into diverse neuronal types as defined by the practitioner's operative criteria.

A glial cell or "glial-like" cell includes a cell that has one or more glial-specific features, associated with a glial cell type, including a morphological, physiological and/or  
15 immunological feature specific to a glial cell (e.g. astrocytes or oligodendrocytes), for example, expression of the astroglial marker fibrillary acidic protein (GFAP) or the oligodendroglial marker O4.

In one embodiment, the transdifferentiated cell exhibits a lack of mitotic activity under cell culture conditions which induce differentiation in neural progenitor cells, such as nutrient-  
20 rich medium containing neurotrophins (e.g., DMEM/F12, plus neuronal growth supplement B27 [Gibco-BRL],  $10^{-7}$  M all-trans retinoic acid and brain derived neurotrophic factor [BDNF; 20 ng/mL], at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>).

In other embodiments, the cell is a GABAergic cell, i.e., a cell that produces gamma aminobutyric acid, the predominant inhibitory neurotransmitter in the central nervous system.  
25 For example, treating the transdifferentiated cells plated on laminin coated surface with all-trans retinoic acid ( $10^{-7}$  M) and BDNF (10 ng/mL) for 5-15 days results in development of GABAergic neurons or neuron-like cells.

In still other embodiments, the transdifferentiated cell is a dopaminergic cell, i.e., a cell that produces dopamine, a catecholamine neurotransmitter and hormone. These cells  
30 result from post-transdifferentiation treatment with glial conditioned media and sonic hedgehog aminoterminal peptide.

In one embodiment, the transdifferentiated cell has a morphological, physiological

and/or immunological feature of an glial cell, such as expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP).

It is a benefit of the inventive transdifferentiated cell(s) that they can be implanted into, and/or grafted to, a patient in need for use in cell therapy or gene therapy approaches to neurological injury or disease. Advantageously, the transdifferentiated cell(s) can be used directly without requiring a step for cell expansion.

The present invention also relates to a cell culture derived from the inventive transdifferentiated cell(s) originated from epidermal basal cells. The cell culture contains a plurality of cells that have a morphological, physiological and/or immunological feature of a neural progenitor, neuronal, or glial cell, for example, expression of one or more specific marker(s). The cell culture is maintained under culture conditions that favor the in vitro propagation of neural progenitors, neuronal, or glial cells, for example, suitable temperature, pH, nutrients, and growth factors, as known in the art. The cell culture can be manipulated to express additional or different neural-specific or glial specific-markers in the presence of specific exogenously supplied signal molecules.

The features and properties of the transdifferentiated cells and cell cultures of the present invention make them viable as a fundamental biotechnology tool directed to the human nervous system. Moreover, the transdifferentiated cells and cell cultures of the invention meet the technical criteria for use in cell and gene therapies directed to nervous system disease and disorders. First, the inventive transdifferentiated cells and cell cultures can display morphological and functional features of neurons: they can develop long neurites with a growth cones at the end, they express a number of neural specific genes, and they do not continue to proliferate in conditions which induce differentiation. Therefore, for use in gene therapy and cell therapy, the transdifferentiated cells can not only deliver a single potential gene or factor, but additionally are capable of furnishing the whole infrastructure for nerve regeneration.

Second, the cultured transdifferentiated cells can be propagated as multipotential nervous system progenitor cells in conditions that favor proliferation and do not induce differentiation. Hence, these progenitor cells retain the capacity to become many different types of neurons or neuron-like cells depending upon the environmental cues to which they are exposed, for example GABAergic or dopaminergic cells. This broad plasticity suggests that, once implanted, the cells of the present invention will retain the capacity to conform to



many different host brain regions and to differentiate into neurons specific for that particular host region. These intrinsic properties of the transdifferentiated neurons are different from the existing tumorigenic cell lines, where some neuronal differentiation can be induced under artificial conditions.

5 Third, another advantage of the inventive transdifferentiated cells and cell cultures is that there is no need for cell expansion, as is required with stem cell technology used to generate neurons for cell and gene therapies. Thus, the transdifferentiated cells of the present invention are sufficient in number (several millions of cells) for direct implantation. In summary, the unique characteristics and properties of these transdifferentiated cells and cell  
10 cultures yield an invention of significant scientific and commercial potential.

Consequently, the present invention also relates to a method of delivering locally secretable regulatory factors in vivo within the nervous system of a mammalian subject, including a human. The method involves transdifferentiating a population of epidermal basal cells from the subject, in accordance with the inventive method described above, into cells  
15 having a morphological, physiological and/or immunological feature of a neuronal cell. Epidermal basal cells of the particular subject requiring treatment with secretable regulatory factors are preferred, in order to avoid transplant rejection. Before, during, or after the transdifferentiation step, the cells are genetically modified, in vitro, by known methods as described above, with an expression vector comprising a DNA encoding a predetermined  
20 secretable regulatory factor, a biochemical precursor thereof, or an enzyme that catalyzes the biosynthesis of either the factor or a precursor, and the genetically modified cells are selected, cultured, and implanted into the subject. Transfecting or otherwise genetically modifying the cells involves delivery of an expression vector comprising the DNA encoding the predetermined secretable regulatory factor, a precursor thereof, or an enzyme that catalyzes  
25 the biosynthesis of either the factor or a precursor. Expression of the gene for the regulatory factor, precursor, or enzyme is under the transcriptional control of a neuronal specific promoter (for example, neurofilament promoter or neural-specific enolase promoter). Enhanced secretion of the regulatory factor by the genetically modified cells results. This does not depend on the formation of functional interneuronal connections such as those that  
30 transmit electrochemical sensory, motor, or cognitive signals.

Examples of secretable regulatory factors include dopamine and neurotrophic factors, such as nerve growth factor (NGF), brain-derived growth factor (BDGF), neurotrophin-3,

neurotrophin-4, insulin-like growth factor, ciliary neurotrophic factor (CNTF), or glia-derived neurotrophic factor. Nervous system disorders that can be treated using the method include Alzheimer's disease, diabetic neuropathy, taxol neuropathy, compressive neuropathy, AIDS-related neuropathy, amyotrophic lateral sclerosis, large fiber neuropathy, vincristine neuropathy, and Parkinson's disease.

Implantation of the genetically modified transdifferentiated cells is by conventional methods (e.g., stereotactic injection). Implantation is into an appropriate site within the nervous system of the subject, depending on the particular disorder being treated.

By way of example, the method is advantageous in the treatment of Parkinson's disease, which results mainly from degeneration of dopamine releasing neurons in the substantia nigra of the brain and the subsequent depletion of dopamine neurotransmitter in the striatum. The cause of this degeneration is unknown, but the motor degeneration symptoms of the disease can be alleviated by peripherally administering the dopamine precursor, L-dopa, at the early onset of the disease. As the disease continues to worsen, L-dopa is no longer effective, and currently, no further treatment is available. One promising treatment being developed is to transplant dopamine-rich substantia nigra neurons from fetal brain into the striatum of the brain of the patient. Results obtained from various clinical studies look extremely optimistic, however, it is estimated that up to 10 fetal brains are needed to obtain a sufficient number of cells for one transplant operation. This requirement renders unfeasible the wide application of the transplantation of primary fetal neurons as a therapeutic treatment modality. This problem is resolved, however, by utilizing the transdifferentiated neurons or neuron-like cells of the present invention for treatment of Parkinson's disease.

It is now widely recognized that transplantation of dopamine producing cells is the most promising therapy of treating severe Parkinson's disease. Stable cell populations or cell lines genetically modified to produce dopamine is essential to an effective therapy. Since tyrosine hydroxylase (TH) is the key enzyme for dopamine biosynthesis, cloning the TH gene into an appropriate expression vector is a first step in the method of treatment. Human TH cDNA is cloned into a eukaryotic expression vector. After gene delivery, clones of genetically modified cells that demonstrate stable integration of the expression vector are selected for implantation purposes. Thus, transdifferentiated cells of the present invention are produced with enhanced expression of the tyrosine hydroxylase (TH) gene.

These cells are implanted into the patient's striatum or brain. The cells are typically

implanted bilaterally in the caudate nucleus and putamen by using Magnetic Resonance Imaging (MRI)-guided stereotactic techniques. A stereotactic frame is affixed to the skull after administration of local anesthesia. The caudate nucleus and putamen are then visualized with MRI. Thereafter, under general anesthesia, about 10 passes with very thin stereotactic  
5 needles are made bilaterally, 4 mm apart in the caudate and putamen. The rationale for track spacing at approximately 4 mm intervals is important because fetal dopamine neuron processes grow several millimeters, reinnervating the host's striatum. Four trajectories for needle tracks in the caudate and six tracks in the putamen are calculated to avoid the posterior limb of the internal capsule. The entry points for the putamen and caudate tracks are at two  
10 different sites on the surface of the brain. The tracks to the putamen are approximately vertical with reference to a coronal plane, while the approach to the caudate is at an angle of approximately 30 degrees. After the implantation surgery, the implanted cells secrete dopamine in situ alleviating the subject's Parkinson's disease symptoms.

The present invention also relates to a method of isolating or identifying a novel nerve  
15 growth (or neurotrophic) factor that employs transdifferentiated cells of the invention. The methods involve transdifferentiating a population of proliferating epidermal basal cells into neuronal progenitor cells, neuronal cells, or glial cells; culturing the transdifferentiated cells; exposing the cultured cells, in vitro, to a potential nerve growth factor; and detecting the presence or absence of an effect of the potential nerve growth factor on the survival of the  
20 cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of the cells. The transdifferentiated cells are assayed in vitro to determine whether there is an effect of a potential nerve growth factor on a physiological or molecular biological property of the transdifferentiated cells. For example, which, if any, neuronal or glial cell types develop from neural progenitors, the maturation of particular cell types, and the  
25 continued support of cell survival (e.g., effect on cell numbers) can be determined. In addition, experimental techniques, based on an electrophysiological characteristic (patch clamp, different types of intracellular recording, etc.) or molecular biological properties (gene expression profiles, organization of cytoskeleton, organization of ion channels and receptors etc.) can be used to detect the effects of potential nerve growth/neurotrophic factors on  
30 particular cell types. The potential factor can be, but need not be an isolated compound; the inventive transdifferentiated cells can be used to test, or assay, the effect, or lack thereof, of potential growth factor sources (tissue homogenates, expression cDNA library products, etc.) on the survival and functional characteristics of the cells to detect candidates for further

isolation.

The use of transdifferentiated epidermal basal cells bypasses the difficulties in isolating and culturing neuronal cell types from the brain, and, therefore, the inventive method of identifying a novel nerve growth factor is a benefit to research in this area.

5        This same advantage pertains to the inventive method of using cells transdifferentiated from epidermal basal cells to identify a potential chemotherapeutic agent (i.e., a drug) by transdifferentiating a population of epidermal basal cells into neuronal progenitor, neuronal, or glial cells by the inventive method described above; culturing the transdifferentiated cells; exposing the cultured cells, in vitro, to a potential chemotherapeutic agent; and detecting the  
10        presence or absence of an effect of the potential chemotherapeutic agent on the survival of the cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of said cells. An effect altering cell survival, a morphological or electrophysiological characteristic and/or a molecular biological property of the cells indicates the activity of the chemotherapeutic agent. The potential chemotherapeutic agent can be an  
15        agent intended to treat a nervous system disorder, or the method can be used to test an agent intended or proposed for treating any other type of disorder for its effects on cells possessing neural progenitor, neuronal or glial cell features. Experimental assay techniques, based on an electrophysiological characteristic (patch clamp, different types of intracellular recording, etc.) or molecular biological properties (gene expression profiles, organization of cytoskeleton,  
20        organization of ion channels and receptors etc.), as well as cell survival, can be used to detect the effects of potential chemotherapeutic agents on particular cell types. The potential chemotherapeutic agent can be, but need not be an isolated compound; the inventive transdifferentiated cells can be used to test, or assay, the effect of potential chemotherapeutic agents (tissue homogenates, expression cDNA library products, etc.) on the survival and  
25        functional characteristics of the cells to detect candidates for further isolation and development. Since epidermal basal cells transdifferentiated into neurons or neuron-like cells in culture can express several neurotransmitters and receptor complexes, cell lines derived from these cells can be developed which, when differentiated into mature neurons, would display a unique profile of neurotransmitter receptor complexes. Such neuronal cell lines can  
30        be valuable tools for designing and screening potential chemotherapeutic agents.

The present invention also relates to a method of using transdifferentiated cells or cell cultures to screen a potential chemotherapeutic agent to treat a nervous system disorder of

genetic origin, for example, Alzheimer's disease. The method is practiced in accordance with the above-described method of screening a potential chemotherapeutic agent, however, epidermal basal cells derived from a human subject diagnosed with a particular nervous system disorder of genetic origin are transdifferentiated and the effect of the potential chemotherapeutic agent on a physiological or molecular biological property of the transdifferentiated cells is assayed in vitro. Different types of neuronal cells derived from transdifferentiated epidermal basal cells of the present invention will provide novel methodologies to screen potential chemotherapeutic agents. For example, using the epidermal basal cells from patients with genetic defects that affect the nervous system will make it possible to manipulate environmental cues to induce the development of various types of neuronal cell populations that also carry this genetic defect. These cells can be used for screening of chemotherapeutic agents which potentially have effect on the diseased neurons or neuron-like cells displaying a specific set or profile of neurotransmitters, receptors complexes, and ion channels.

Regardless of whether under a particular set of environmental conditions, in vitro, the inventive transdifferentiated cells express all the biochemical, morphological, and functional characteristics of a given neuronal population in vivo, they provide at least useful simulations of neurons for identifying, screening, or isolating promising new drugs or neural growth factors. Once the potential of a chemical agent is identified by the inventive methods, then, further research can be done to verify its actual effect on particular cell populations of the nervous system and ascertain its clinical usefulness. Thus, the inventive methods of screening a potential chemotherapeutic agent are of benefit in finding and developing the next generation of pharmaceutical drugs narrowly aimed at modifying specific brain functions.

The present invention also relates to a kit for transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell. The kit is an assemblage of materials for facilitating the transdifferentiation of epidermal basal cells in accordance with the inventive methods.

The inventive kit preferably includes the following expression vectors and reagents: one or more expression vector(s) containing cDNA(s) encoding a neurogenic transcription factor, or fragment(s) thereof, such as NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, and MyT1, or non-human, homologous counterparts, at least one antisense oligonucleotide corresponding

to a segment or portion of the human MSX1 gene and/or the human HES1 gene, or non-human, homologous counterparts, a retinoid and at least one neurotrophin, such as BDNF, CNTF, PDGF, NGF, NT-3, NT-4, and/or sonic hedgehog, or an active fragment of any of these. Preferably but not necessarily, the kit contains instructions for using the kit components  
5 for transdifferentiating a mammalian subject's epidermal basal cells, for example, starting with a patient's own skin cells.

The materials or components assembled in the inventive kit can be provided to the practitioner stored in any convenient and suitable ways that preserve their operability and utility. For example the components can be in dissolved, dehydrated, or lyophilized form;  
10 they can be provided at room, refrigerated or frozen temperatures. The kits of the present invention preferably include instructions for using the materials or components effectively for practicing any or all of the inventive methods.

The foregoing descriptions of the methods, transdifferentiated cells, cell cultures, and kits of the present invention are illustrative and by no means exhaustive. The invention will  
15 now be described in greater detail by reference to the following non-limiting examples.

#### EXAMPLE I

##### Preparation of Epidermal Cell Culture and Dedifferentiation

Human adult skin was obtained from surgery procedures or skin biopsy. Before cultivation, as much as possible of the subepidermal tissue was removed by gentle scraping.  
20 Primary cultures were initiated by culturing 4-10 2x2 mm explants/35 mm tissue culture dish in Dulbecco's modified Eagle medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc.) with 15% fetal calf serum (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc.), 0.4 µg/ml hydrocortisone, and 10 ng/ml epidermal growth factor (Collaborative Research, Inc.). The medium was changed every three days. Thirty to thirty-five day old cultures were used for subsequent experimentation. Before  
25 transfections and further treatment, differentiated cell layers were stripped off by incubating the cultures in Ca<sup>2+</sup>-free minimal essential medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc.). Generally, a calcium free media contains less than 10<sup>-6</sup> M Ca<sup>2+</sup> ions. After 72 hours, suprabasal layers were detached and removed after shaking of the culture dish. This calcium free treatment also dedifferentiates epidermal basal cells, as they loose expression of  
30 cytokeratines which are characteristic of epidermal cells. The cultures were then refed medium with normal Ca<sup>2+</sup> concentration, that is, 2mM calcium ions containing all the

additives, that is, FCS (15%), hydrocortisone (0.4 µg/ml), EGF (10 ng/ml), and cultured 18-24 hours at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

## EXAMPLE II

### Transfections of Cultured Epidermal Cells

5           Epidermal basal cells were transfected using a Ca-coprecipitation protocol (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc.), Lipofectamine reagent (GIBCO-BRL, Life Technologies, Inc.), and immunoliposomes (Holmberg et al., 1994). Ca-coprecipitation and Lipofectamine reagent were used as indicated by manufacturer. Ten µg of either pRcCMVneo eukaryotic expression vector (Invitrogen) alone, or cloned pRcCMVneo vectors containing either  
10   β-galactosidase (CMV-β-gal), NeuroD1 (CMV-ND1), NeuroD2, (CMV-ND2), hASH1 (CMV-hASH1), Zic1 (CMV-Zic1), or hMyT1 (CMV-MyT1) cDNAs were used to transfect cells in one 35 mm tissue culture dish. All the cDNAs were cloned in our laboratory using sequence information from GenBank: Accession numbers: hNeuroD1 D82347 (SEQ. ID. NOS.:1 and 7); U50822 (SEQ. ID. NOS.:2 and 8); hNeuroD2 U58681 (SEQ. ID. NOS.:3 and  
15   9); hASH1 L08424 (SEQ. ID. NOS.:4 and 10); hZic1 D76435 (SEQ. ID. NOS.:5 and 11); hMyT1 M96980 (SEQ. ID. NOS.:6 and 12). All of the cloned genes were of human origin.

          Oligonucleotide primers were designed based on the sequences of interest and used to amplify full length cDNAs using RT-PCR techniques and human fetal brain mRNA as a template. Also, NeuroD1, NeuroD2 and hASH1 cDNAs were isolated by screening the  
20   human fetal brain cDNA library (Stratagene). All cDNA sequences were verified by sequencing and *in-vitro* translation using reticulocyte lysate an *in-vitro* translation system (Amersham).

## EXAMPLE III

### Preparation and Use of Antisense Oligonucleotides

25           Human MSX1 antisense oligonucleotides sequences

1) 5'-GACACCGAGTGGCAAAGAAGTCATGTC (first methionine) (MSX1-1; SEQ. ID. NO.:13); and

2) 5'-CGGCTTCCTGTGGTCGGCCATGAG (third methionine) (MSX1-2; SEQ. ID.

NO.:14) were synthesized. Additionally, human full length HES1 cDNA from the human fetal brain cDNA library was isolated and sequenced (Stratagene). Two antisense oligonucleotides corresponding to the human HES1 open reading frame 5' sequence

1) 5'-ACCGGGGACGAGGAATTTTCTCCATTATATCAGC (HES1-1; SEQ. ID. NO.:15)

5 and middle sequence

2) 5'-CACGGAGGTGCCGCTGTTGCTGGGCTGGTGTGGTGTAGAC (HES1-2; SEQ. ID.

NO.:16) were synthesized. The preferred antisense oligonucleotides are thio-modified by known methods. Therefore, thio-modified versions of these oligonucleotides corresponding to human MSX1 and human HES1 were synthesized and used to increase the stability of  
10 oligonucleotides in the culture media and in the cells.

In the experimental protocol, described below, oligonucleotides were directly added to the culture media at the concentration of 5-10  $\mu$ M. Randomly synthesized oligonucleotides and oligonucleotides corresponding to the sequence of human albumin were used as controls.

15

#### EXAMPLE IV

##### Analytical Method to Detect Transdifferentiation

Immunohistochemical detection of neurofilament M expression was chosen as one marker for neuronal differentiation. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and processed according to the immunohistochemical detection protocol recommended by the  
20 antibody manufacturer (Sigma, Inc.). Neurofilament M positive cells were counted by fluorescent microscopy. Several additional antibodies to neuronal antigens were used to characterize, in more detail, the nature of basal cell transdifferentiation into neurons. Antibodies against neural specific tubulin (Sigma, Inc.), neural specific enolase (Inctar, Inc.), microtubule associated protein 2 (MAP2, Boehringer Mannheim), and neurofilaments Mix  
25 (Sternberger) were used as recommended by the antibody manufacturer. Antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP, Inctar) were used to detect differentiation of astrocytes from epidermal basal cells. Additionally, morphological criteria were used to detect transdifferentiation of epidermal basal cells into neuronal cells. Cells with neurites, or processes, longer than three cell diameters (50 microns or longer), and expressing at least one  
30 neuronal marker (antigen), were counted as neurons.



## EXAMPLE V

### Transdifferentiation Protocol and Experimental Results

Various combinations of neural regulators leading to expression, or over-expression, of neurogenic bHLH and/or Zn-finger transcription factors and substantially simultaneous suppression of MSX1 and/or HES1 expression were tested to ascertain their effect on transdifferentiation of epidermal basal cells. Results of these experiments are presented in Table 1.

For these experiments, a immunoliposome transfection method is preferred, since it resulted in the highest transfection efficiency. Other methods of transfection that yield high transfection efficiency, such as Ca-coprecipitation, Lipofectamine, or Fugene-6 (Boehringer Mannheim, Inc.), known in the art, can be used instead of immunoliposomes. After transfection and antisense oligonucleotide treatments, cells were grown in the presence of all-trans retinoic acid ( $10^{-7}$ M) and BDNF (20ng/ml) for 5 days before immunostaining.

Table 1 shows the results of the transdifferentiation procedures described above leading to the conversion of epidermal basal cells into neuronal Neurofilament—expressing cells *in-vitro*. Various combinations of simultaneous expression, or near simultaneous expression, of neurogenic bHLH and/or Zn-finger transcription factors and suppression of expression of MSX1 and/or HES1 genes were used to initiate transdifferentiation. Neurofilament M immunostaining and evaluation of the length of neurites, or processes (50 microns or longer were counted as neurites) were used to identify neuronal cells. Controls using pRCMV vector plasmid and randomly synthesized oligonucleotides, and oligonucleotides corresponding to the sequence of human albumin, showed no transdifferentiation of epidermal basal cells. Cells expressing Neurofilament M were counted by fluorescent microscopy. Five to seven fields of immuno-stained cells were counted for each treatment, each field containing 100-300 cells.

**TABLE I**  
**TRANSDIFFERENTIATION OF EPIDERMAL BASAL CELLS**

<b><u>TREATMENT</u></b>		<b>% NEURONAL CELLS</b>
		<b><u>(i.e., % Neurofilament M expressing)</u></b>
5	control, no treatment:	0
<b>Over-expression:</b>		
	NeuroD1	0.01
	NeuroD2	0.03
	ASH1	0
10	Zic1	0
	MyT1	0
	NeuroD1+Zic1	0.04
	NeuroD2+Zic1	0.05
	NeuroD1+NeuroD2+Zic1	0.05
15	NeuroD1+MyT1	0.02
	NeuroD2+MyT1	0.03
	NeuroD1+NeuroD2+MyT1	0.05
	NeuroD1+NeuroD2+MyT1+Zic1	0.05
<b>Antisense oligonucleotides:</b>		
20	MSX1-1	0
	MSX1-2	0
	HES1-1	0
	HES1-2	0
	MSX1-1+MSX1-2+HES1-1+HES1-2	0

**Combination of antisense oligonucleotides and over-expression of neurogenic factors:**

	NeuroD1+NeuroD2+MSX1-1+MSX1-2	0.5
	NeuroD1+NeuroD2+HES1-1+HES1-2	0.8
	NeuroD1+NeuroD2+MSX1-1+HES1-1	7
5	Zic1+MSX1-1+MSX1-2	0.05
	Zic1+HES1-1+HES1-2	3
	MyT1+MSX1-1+MSX1-2	0.01
	MyT1+HES1-1+HES1-2	0.5
	MyT1+MSX1-1+HES1-1	0.9
10	NeuroD1+Zic1+MSX1-1	11
	NeuroD1+Zic1+MSX1-1+HES1-1	20
	NeuroD1+MyT1+MSX1-1	10
	NeuroD1+MyT1+MSX1-1+HES1-1	26
	NeuroD1+Zic1+MyT1+MSX1-1+HES1-1	25

15

In summary, transdifferentiation of epidermal cells into neurons is best achieved by the combined effect of expressing neurogenic transcription factors, which positively regulate neuronal differentiation, and antisense oligonucleotides, corresponding to negative regulators of neuronal differentiation. The experimental data indicate that a preferred method of transdifferentiation of epidermal cells into neurons includes the expression of both a bHLH and zinc finger transcription factor, which positively regulate neuronal differentiation, in the presence of at least one antisense DNA, corresponding to a negative regulator of epidermal differentiation. Additionally, the expression of two bHLH transcription factors in the presence of two negative regulator antisense DNAs yielded a fairly high percentage of differentiated neurons.

20

25

## EXAMPLE VI

### Characterization of the Transdifferentiated Neuronal Cells

To further evaluate the transdifferentiation process and nature of newly formed neuronal cells, expression of several neuronal marker genes in these cells using immunostaining with specific antibodies against neuronal marker proteins were analyzed. In these experiments, the following combinations of transfection of neurogenic genes and antisense oligonucleotide treatments were used:

NeuroD1+Zic1+MSX1-1+HES1-1

NeuroD1+MyT1+MSX1-1+HES1-1

10 NeuroD1+Zic1+MyT1+MSX1-1+HES1-1

The results of these experiments show that Neurofilament M positive transdifferentiated cells also express neural specific tubulin, neural specific enolase, and microtubule associated protein 2. Expression of a number of neuronal antigens and morphological changes (neurites 50 microns or longer) of transdifferentiated cells shows that the procedure of transdifferentiation results in normal and viable neuronal cells that can be used in cell therapy applications. Moreover, the newly formed neuronal cells of the present invention have the morphological and functional criteria of neurons: they develop long neurites with a growth cones at the end, they express a number of neural specific genes, and they do not continue to proliferate in conditions which induce differentiation, such as, in the presence of all-trans retinoic acid ( $10^{-7}$ M) and BDNF (20ng/ml).

Finally, staining of treated epidermal cell cultures with antibodies against glial fibrillary acidic protein shows that small percentage (around 5%) of cells also express GFAP. This is an indication that transdifferentiated cells acquire characteristics of astroglial cells, either directly or indirectly. One possible explanation is that expression of neurogenic genes and blocking expression of inhibitors of neurogenesis results in formation of neuronal progenitor cells that differentiate both neurons and astroglial cells in vitro.

## EXAMPLE VII

### A Gene Therapy Application for Transdifferentiated Neuronal Cells in Parkinson's Disease

30 Parkinson's Disease results mainly from degeneration of dopamine releasing neurons

in the substantia nigra of the brain and the resulting depletion of dopamine neurotransmitter in the striatum. The cause of this degeneration is unknown, but the motor degeneration symptoms of the disease can be alleviated by peripherally administering the dopamine precursor, L-dopa, at the early onset of the disease. As the disease continues to worsen, L-dopa is no longer effective, and currently, no further treatment is available. One promising treatment being developed is to transplant dopamine-rich substantia nigra neurons from fetal brain into the striatum of the brain of the patient. Results obtained from various clinical studies look extremely optimistic, however, it is estimated that up to 10 fetal brains are needed to obtain a sufficient number of cells for one transplant operation. This requirement renders unfeasible the wide application of the transplantation of primary fetal neurons as a therapeutic treatment modality. This problem is resolved, however, by utilizing the transdifferentiated neuronal cells of the present invention for treatment of Parkinson's disease.

It is now widely recognized that transplantation of dopamine producing cells is the most promising therapy of treating severe Parkinson's disease. Stable cell populations or cell lines genetically engineered to produce dopamine is essential to an effective therapy. Since tyrosine hydroxylase (TH) is the key enzyme for dopamine synthesis, cloning this gene in an appropriate expression vector is a first step in the method of treatment. Thus, human TH cDNA will be cloned into eukaryotic expression vector under the control of neuronal specific promoter (for example, neurofilament, neural specific enolase). Expression constructs will be transfected into epidermal basal cells of a patient, using high efficiency transfection protocols (Lipofectamine, Ca-coprecipitation etc.), followed by selection of the clones which demonstrate stable integration of the expression vector. These clones will be used for transdifferentiation procedures to obtain newly formed neurons that express TH. Thus, human neurons derived from transdifferentiated cells of the present invention will be produced which express the tyrosine hydroxylase (TH) gene. These cells will be transplanted into the patient's striatum or brain. First, the cells will be implanted bilaterally in the caudate nucleus and putamen by using Magnetic Resonance Imaging (MRI)-guided stereotactic techniques. The stereotactic frame will be fixed to the skull after administration of local anesthesia. The caudate nucleus and putamen then will be visualized with MRI. Thereafter, under general anesthesia, ten passes with very thin stereotactic needles will be made bilaterally, 4 mm apart in the caudate and putamen. The rationale for track spacing at approximately 4 mm intervals is important because fetal dopamine neuron processes grow

several millimeters, reinnervating the host's striatum. Four trajectories for needle tracks in the caudate and six tracks in the putamen will be calculated to avoid the posterior limb of the internal capsule. The entry points for the putamen and caudate tracks will be at two different sites on the surface of the brain. The tracks to the putamen will be approximately vertical with reference to a coronal plane, while the approach to the caudate will be at an angle of approximately 30 degrees.

#### EXAMPLE VIII

##### A Gene Therapy Application for Transdifferentiated Neuronal Cells for the Delivery of Nerve Growth Factors to the Brain

The transdifferentiated neuronal cells of the present invention can be transfected with nucleic acids encoding nerve growth (neurotrophic) factors of potential interest. Primary examples of growth factors currently in clinical trials or under full development by various companies are listed below in Table II. So far, tests of the effects of growth factors on the brain and nervous system have been limited to direct peripheral injection of large doses of these factors, which carries a significant risk of side effects, since most growth factors affect many different populations of neurons and non-neural tissues. These problems can be overcome by generating transdifferentiated neuronal cell lines that stably express these growth factors and secrete the growth factors after transplantation.

TABLE II  
NEUROTROPIC FACTORS AND DISEASES

<u>NEUROTROPIC FACTOR</u>	<u>DISEASE</u>
Nerve growth factor (NGF)	Alzheimer's Disease Diabetic neuropathy Taxol neuropathy Compressive neuropathy AIDS-related neuropathy
Brain-derived growth factor (BDNF)	Amyotrophic lateral sclerosis
Neurotrophin 3 (NT-3)	Large fiber neuropathy
Insulin-like	Amyotrophic lateral sclerosis

	growth factor (IGF)	Vincristine neuropathy
		Taxol neuropathy
	Ciliary neurotrophic factor (CNTF)	Amyotrophic lateral sclerosis
5	Glia-derived neurotrophic factor	Parkinson's Disease

Local delivery of neurotrophic factors has been suggested as a method to treat several neurological conditions (see Table II). Transdifferentiated epidermal cells from patients own skin represent a vehicle for neurotrophic factor delivery. Human neurotrophic factors cDNAs will be cloned into eukaryotic expression vector under the control of neuronal specific promoter (for example, neurofilament or neural specific enolase). Expression constructs will be transfected into epidermal basal cells using high efficiency transfection protocols (Lipofectamine, Ca-coprecipitation etc.). This procedure is followed by selection of the clones that demonstrate stable integration of expression vector. These clones will then be used for transdifferentiation procedures to obtain newly formed neurons that express particular neurotrophic factors at significantly high levels. Neuronal cells that express these neurotrophic factors will be transplanted into the patients brain and/or nervous system, as described in Example VII, into locations which are in need of neurotrophic factor delivery.

20

#### EXAMPLE IX

##### A Cell Therapy Application for Transdifferentiated Neuronal Cells as a Treatment for Neurotraumas, Stroke and Neurodegenerative Disease

In most neurological diseases, unlike Parkinson's Disease, the underlying cause of symptoms cannot be attributed to a single factor. This condition renders the therapeutic approach of introducing a single gene by gene therapy or single neuronal type replacement by cell therapy ineffective. Rather, replacement of the lost, or diseased, host neuronal cells, or even neuronal networks, by healthy cells and neuronal networks is required. The present invention enables us to develop different types of neurons from a patient's own epidermal basal cells. These newly formed neurons can be cultured separately, or together, to stimulate formation of functional neuronal networks that can be used for replacement therapies. Alternatively, different types of neurons can be transplanted and induced to form functional

connections between themselves and host neurons, *in situ*, in the brain or in the spinal cord. Ability to differentiate *de novo*, formed neurons into variety of neuronal types *in vitro* and *in vivo* makes this approach especially powerful and useful for replacement of complex structures and networks in the nervous system.

5           As an example for restoring local circuitry in the nervous system is the formation of a functional "pattern generator" in the injured spinal cord. Several data demonstrate that a pattern generator functions in humans, and moreover, that physical therapy can stimulate stepping and use of legs in spinal cord injury patients. (For a review, see Wickelgren, I. 1998. Teaching the spinal cord to walk. Research News. *Science* 279, 319-321. 1998). The pattern  
10 generator involves different types of interneurons that connect sensory afferents and motoneurons. Transdifferentiated epidermal basal cells will be treated so as to form all major neuronal cell types that are required for functioning of pattern generator. Here cells will be mixed together wherein natural synapse formation will occur. Since pattern generators are composed of major excitatory (glutamatergic, cholinergic) and inhibitory  
15 (glycinergic including Renshaw cells, GABAergic) neurons, first, these neuronal types will be generated by the methods of the present invention described above. Second, excitatory and inhibitory neurons produced in the first step will be grown in co-cultures to stimulate formation of functional connections between the neuron cells. This step will yield aggregates of cells which will be transplanted into the injured spinal cord of a patient. An  
20 alternative approach will be to develop different neuronal cell types separately, and mix these before transplantation into the spinal cord. By use of these procedures which permits the transplantation of a large number of different excitatory and inhibitory neurons, a functional set of neuronal connections, capable of supporting local functions of the spinal cord will be developed.

25

#### EXAMPLE X

##### Use of Transdifferentiated Neuronal Cells as a Research Tool in the Search for Novel Growth Factors

One of the central principles of modern neurobiology is that each of the major projection neurons, if not all neurons, requires specific signals (trophic factors) to reach their  
30 target cells and survive. Neuropathies in many diseases may be caused by, or involve lack of, such growth factors. These growth factors represent the next generation of preventative



and therapeutic drugs for nervous system disorders, and hence the enormous capitalization has been invested in the search and development of novel growth factors by the biotechnology industry.

5       Implicit in the observation that mature neurons can be produced from transdifferentiated neurons is the fact that various growth factors can be tested using these cells to assay for final determination of cell types, maturation, and continued support of cell survival. Most of the growth factors known so far in the nervous system were discovered by their effects on peripheral nerves and these most likely represent a very minor fraction of existing growth factors in the brain.

10       Search for growth factors from the brain has been difficult mainly because particular neuronal cell types are difficult to isolate from the brain and maintain in defined culture conditions. The use of transdifferentiated epidermal cells overcomes this problem and opens new assays to screen potential growth factors.

15       The different types of neuronal cells that are created from transdifferentiated epidermal basal cells provides a novel research tool for the discovery and analyses of the effect of new, and also already characterized, growth/neurotrophic factors. Epidermal basal cells will be transdifferentiated into different types of neuronal cells characterized by a particular subtype of neurons. These specific neuronal cells will be used to test, or assay, the effect of potential growth factor sources (tissue homogenates, expression cDNA library products, etc.) on the survival and functional characteristics of cells. For example, cell number will be counted for the analysis of survival of neuronal cells after exposure to growth factors. A wide spectrum of experimental analyses of the functional characteristics of these neurons, known in the art, can be performed to assay the effect of these novel growth factors on the newly created neurons. Experimental techniques, based on an electrophysiological characteristic (patch clamp, different types of intracellular recording, etc.) and molecular biological (gene expression profiles, organization of cytoskeleton, organization of ion channels and receptors etc.) will be used to detect effects of potential growth/neurotrophic factors on particular cell types.

#### EXAMPLE XI

##### 30       Use of Transdifferentiated Neuronal Cells as a Research Tool in Drug Screening

As more and more neurotransmitter receptors and signal transducing proteins are being identified from the brain, it is becoming clear that the dogma of one neurotransmitter

activating one receptor is an over-simplification. Most receptor complexes in neurons are composed of protein subunits encoded by several genes and each gene synthesizes many different variations of the protein. These variations result in a wide range of possible receptor combinations, and not a single receptor that can interact with a neurotransmitter. Consequently, a range of signal output may be produced by a single neurotransmitter action. The specific signal effected by a neurotransmitter on a neuron, then, depends on which receptor complex is produced by the cell. Thus, cellular diversity must parallel the molecular diversity and constitute a major structural element underlying the complexity of brain function.

10 Drug discovery by traditional pharmacology had been performed without the knowledge of such complexity using whole brain homogenate and animals. These studies mostly produced analogs of neurotransmitters with broad actions and side effects. The next generation of pharmaceutical drugs aimed at modifying specific brain functions may be obtained by screening potential chemicals against neurons displaying a specific profile of neurotransmitters, receptors complexes, and ion channels.

15 Epidermal basal cells transdifferentiated into neurons in culture can express several neurotransmitters and receptor complexes. Cell lines derived from these cells can be developed which, when differentiated into mature neurons, would display a unique profile of neurotransmitter receptor complexes. Such neuronal cell lines will be valuable tools for designing and screening potential drugs.

20 Regardless of whether under a particular set of environmental conditions, in vitro, the inventive transdifferentiated cells express all the biochemical, morphological, and functional characteristics of a given neuronal population in vivo, they provide at least useful simulations of neurons for identifying, screening, or isolating promising new drugs or neural growth factors. Once the potential of a chemical agent is identified by the inventive methods, then, further research can be done to verify its actual effect on particular cell populations of the nervous system and ascertain its clinical usefulness. Thus, the inventive methods of screening a potential chemotherapeutic agent are of benefit in finding and developing the next generation of pharmaceutical drugs narrowly aimed at modifying specific brain functions.

30 Different types of neuronal cells created from transdifferentiated epidermal basal cells of the present invention will provide novel methodologies to screen potential drugs. For example, using the epidermal basal cells from patients with genetic defects that affect nervous

system will make it possible to create various types of neuronal cells which also carry this genetic defect. These cells will be used for screening of drugs which potentially have effect on the diseased neurons. Epidermal basal cells will be transdifferentiated into various types of neuronal cells with characteristics of the desired subtype of neurons. These specific  
5 neuronal cells will be used to test, or assay, the effect of potential drugs on the survival and functional characteristics of the cells. Cell number will be counted for the analysis of survival of neuronal cells after exposure to drugs. A wide spectrum of electrophysiological (patch clamp, different types of intracellular recording etc.) and molecular biological (gene expression profiles, organization of cytoskeleton, organization of ion channels and receptors  
10 etc.) techniques can be used to detect effects of potential drugs on particular cell types.

In summary, the transdifferentiation nerve cell technology of the present invention offers broad and significant potentials for treating nervous system disorders in both the areas of cell and gene therapy, as well as offering a potential new source of human neurons for research and drug screening.

15 While the invention can be described in connection with what is presently considered to be the most practical and preferred embodiments, it is to be understood that the invention is not limited to the disclosed embodiments, but on the contrary is intended to cover various modifications and equivalent arrangements included within the spirit and scope of the description of the invention and the appended claims. Thus, it is to be understood that  
20 variations in the present invention can be made without departing from the novel aspects of this invention as described in the specification and defined in the claims.

# SEQUENCE LISTING

<110> Cedars-Sinai Medical Center  
Michel F. Levesque, M.D.  
Thomas Neuman, Ph.D.

<120> Transdifferentiation of Transfected Epidermal  
Basal Cells Into Neural Progenitor Cells, Neuronal Cells  
And/Or Glial Cells

<130> CEDAR 044303

<140> 09/234,332

<141> 1999-01-20

<160> 16

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2502

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> Neuro D1 gene: Genbank accession D82347

<400> 1

cggccacgac	acgaggaatt	cgccccacgca	ggagggcagg	cgcccgagg	ccccagggtt	60
atgagactat	cactgctcag	gacctactaa	caacaaagga	aatcgaaaca	tgaccaaatc	120
gtacagcgag	agtgggctga	tgggagagcc	tcagccccc	ggcctccaa	gctggacaga	180
cgagtgtctc	agttctcagg	acgaggagca	cgaggcagac	aagaaggagg	acgacctcga	240
agccatgaac	gcagaggagg	actcactgag	gaacggggga	gaggaggagg	acgaagatga	300
ggacctggaa	gaggaggaag	aagaggaaga	ggaggatgac	gatcaaaagc	ccaagagacg	360
cggccccaaa	aagaagaaga	tgactaaggc	tcgcctggag	cgttttaaat	tgagacgcat	420
gaaggctaac	gcccgggagc	ggaaccgcat	gcacggactg	aacgcggcgc	tagacaacct	480
gcgcaagggtg	gtgccttgct	attctaagac	gcagaagctg	tccaaaatcg	agactctgcg	540
cttgggccaag	aactacatct	gggctctgtc	ggagatcctg	cgctcaggca	aaagcccaga	600
cctgggtctcc	ttcgttcaga	cgctttgcaa	gggcttatcc	caacctacca	ccaacctggt	660
tgggggctgc	ctgcaactca	atcctcggac	ttttctgcct	gagcagaacc	aggacatgcc	720
ccccacactg	cogacggcca	gcgcttcctt	ccctgtacac	ccctactcct	accagtgcgc	780
tgggctgccc	agtccgcctt	acggtaccat	ggacagctcc	catgtcttcc	acgttaagcc	840
tccgcccgcac	gcctacagcg	cagcgttgga	gcccttcttt	gaaagccctc	tgactgattg	900
caccagccct	tcctttgatg	gacccttcag	cccgcgcgtc	agcatcaatg	gcaacttctc	960
tttcaaacac	gaaccgtccg	cagagtttga	gaaaaattat	gcctttacca	tgactatccc	1020
tgcagcgaca	ctggcagggg	cccaaagcca	cggatcaatc	ttctcaggca	ccgctgcccc	1080
tcgctgcgag	atccccatag	acaatattat	gtccttcgat	agccattcac	atcatgagcg	1140
agtcatgagt	gcccagctca	atgccatatt	tcatgattag	aggcacgcca	gtttcaccat	1200
ttccgggaaa	cgaaccact	gtgcttacag	tgactgtcgt	gtttacaaaa	ggcagccctt	1260

39

tggtgactac	tgctgcaaag	tgcaaatact	ccaagcttca	agtgatatat	gtatttattg	1320
tcattactgc	cttttggaaga	aacaggggat	caaagttcct	gttcacctta	tgtattattt	1380
tctatagctc	ttctatttaa	aaaataaaaa	aatacagtaa	agtttaaaaa	atacaccacg	1440
aatttggtgt	ggctgtattc	agatcgtatt	aattatctga	tcgggataac	aaaatcacaa	1500
gcaataatta	ggatctatgc	aatttttaaa	ctagtaatgg	gccaattaaa	atatatataa	1560
atatatattt	ttcaaccagc	attttactac	ttgttacctt	tcccatgctg	aattattttg	1620
ttgtgatttt	gtacagaatt	tttaatgact	ttttataatg	tggtatttcc	attttaaaac	1680
catgcagctt	catcaatttt	tatacatatc	agaaaagtag	aattatatct	aatttatata	1740
aaataattta	actaatttaa	accagcagaa	aagtgccttag	aaagtatttg	tggtgcctta	1800
gcacttcttt	cctctccaat	tgtaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaattg	1860
cacaatttga	gcaattcatt	tcacttttaa	gtctttccgt	ctccctaaaa	taaaaaccag	1920
aatcataatt	ttcaagagga	gaaaaaatta	agagatacat	tccctatcac	aacatatcaa	1980
ttcaacacat	tacttgacac	agcttgata	tacatattat	aaatagatgc	caacataccc	2040
ttctttaaat	cacaagctgc	ttgactatca	catacaattt	gcactgttac	tttttagtct	2100
tttactcctt	tgcatcccat	gattttacag	agaatctgaa	gctattgatg	tttccagaaa	2160
atataaatgc	atgattttat	acatagtcac	ccccatgggt	ggttgctata	tattcatgta	2220
ataaatctga	gcctaaatct	aatcagggtg	ttaatgttgg	gagttatata	tatagtagtc	2280
aattagtaca	gtagcttaaa	taaattccoc	ccatttaatt	cataattaga	acaatagcta	2340
ttgcatgtaa	aatgcagtc	agaataagtg	ctgtttgaga	tgatgatgctg	gtaccactgg	2400
aatcgatctg	tactgtaatt	ttgtttgtaa	tcctgtatat	tatggtgtaa	tgacacaattt	2460
agaaaacatt	catccagttg	caataaaata	gtattgaaag	tg		2502

<210> 2

<211> 1676

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> Neurogenic helix-loop-helix protein (Neurod 1)  
gene

Genbank accession J50822

<400> 2

acategatta	actttttctc	agaggcatte	attttgtaat	gggcaggtag	ttttcgcaag	60
catttgtaga	ggtttaggga	gtggaagctg	aaggcgatct	ttcttttgat	atagcgtttt	120
tctgcttttc	tttctgtttg	cctctccctt	gttgaatgta	ggaaatcgaa	acatgaccaa	180
atcgtacagc	gagagtgggc	tgatgggcga	gcctcagccc	caaggctcctc	caagctggac	240
agacgagtgt	ctcagttctc	aggacgagga	gcacgaggca	gacaagaagg	aggacgacot	300
cgaagccatg	aacgcagagg	aggactcact	gaggaaacggg	ggagaggagg	aggacgaaga	360
tgaggacctg	gaagaggagg	aagaagagga	agaggaggat	gacgatcaaa	agcccaagag	420
acgcggcccc	aaaaagaaga	agatgactaa	ggctcgccctg	gagcgtttta	aattgagacg	480
catgaaggct	aacgcccggg	agcggaaaccg	catgcacgga	ctgaacgcgg	cgctagacaa	540
cctgcgcaag	gtggtgcect	gctattctaa	gacgcagaag	ctgtccaaaa	togagactct	600
gcgcttgccc	aagaactaca	tctgggctct	gtcggagatc	tcgcgctcag	gcaaaagccc	660
agacctggtc	tccttcgttc	agacgccttg	caagggcctta	tcccaaccca	ccaccaacct	720
gggttgcgggc	tgctgcaac	tcaatcctcg	gacttttctg	cctgagcaga	accaggacat	780
gccccgcac	ctgcgcagcg	ccagcgttcc	cttccctgta	cacccttact	cctaccagtc	840
gcctgggctg	cccagtcgcg	cttacggtac	catggacagc	tcccatgtct	tccacgttaa	900
gcctccgcgc	cacgcctaca	ggcagcgct	ggagcccttc	tttgaaagcc	ctctgactga	960
ttgcaccagc	ccttcctttg	atggacccct	cagcccgcgc	ctcagcatca	atggcaactt	1020
ctctttcaaa	cacgaaccgt	cgcgcgagtt	tgagaaaaat	tatgccttta	ccatgcacta	1080
tcctgcagcg	acactggcag	gggcccacaa	ccacggatca	atcttctcag	gcaccgctgc	1140

40

ccctcgctgc	gagatcccca	tagacaatat	tatgtccttc	gatagccatt	cacatcatga	1200
gcgagtcacg	agtgcccagc	tcaatgccat	atttcacgat	tagaggcacg	ccagtttcac	1260
catttccggg	aaacgaaccc	actgtgctta	cagtgaactgt	cgtgtttaca	aaaggcagcc	1320
ctttgggtact	actgctgcaa	agtgcaata	ctccaagctt	caagtgatat	atgtatttat	1380
tgctattact	gcctttggaa	gaaacagggg	atcaaaagttc	ctgttccacct	tatgtattat	1440
tttctataga	ctcttctatt	ttaaaaata	aaaaaatata	gtaaagttaa	aaaaatacac	1500
cacgaatttg	gtgtggctgt	attcagatcg	tattaattat	ctgatcggga	taacaaaatc	1560
acaagcaata	attaggatct	atgcaatttt	taaactagta	atgggccaat	taaaatatat	1620
ataaatatat	atttcaacca	gcattttact	acttgttacc	tcccatgctg	aattat	1676

<210> 3

<211> 1550

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (0)...(0)

<223> Neurogenic basic-helix-loop-helix protein (Neuro D2) gene Genbank Accession U58681

<221> unsure

<222> (1219)...(1226)

<223> n at 1219 and 1226; n = A, T, G, or C

<400> 3

ccccctcaact	tgtgctgtct	gtctcccctt	cccgcccgcg	ggcgcccttc	aggcaccatg	60
ctgaccgcgc	tggtcagcga	gcccggcctt	ctctcggacg	tgcccaagtt	cgcagctgg	120
ggcgacggcg	aagacgacga	gcccaggagc	gacaagggcg	acgcgccgcc	accgccaccg	180
cctgcgcccc	ggccaggggc	tccggggcca	gcccggggcg	ccaagccagt	ccctctccgt	240
ggagaagagg	ggacggaggg	cacgttggcc	gaggtcaagg	aggaaggcga	gctgggggga	300
gaggaggagg	aggaagagga	ggaggaagaa	ggactggacg	aggcggaggg	cgaaggcccc	360
aagaagcgcg	ggcccaagaa	gcgcaagatg	accaaggcgc	gcttggagcg	ctccaagctt	420
cggcggcaga	aggcgaacgc	gcgggagcgc	aaccgcacgc	acgacctgaa	cgcagccctg	480
gaacaacctgc	gcaaggtggt	gccctgctac	tccaagacgc	agaagctgct	caagatcgag	540
acgctgcgcc	tagccaagaa	ctatatctgg	gcgtctctcg	agatctctgc	ctccggcaag	600
cggccagacc	tagtgtctta	cgtgcagact	ctgtgcaagg	gtctgtcgca	gcccaccacc	660
aattctggtgg	cggctgtctt	gcagctcaac	tctcgcaact	tcctcacgga	gcaaggcgcc	720
gacgggtgccc	gccgtctcca	cggctcgggc	ggcccgcttc	ccatgcaccc	ctaccctgac	780
ccgtgctcgc	gcctggcggg	cgcacagtgc	caggcgggcg	gcggcctggg	cggcgggcgc	840
gcgcacgccc	tgccgaccca	cggctactgc	gccgcctacg	agacgctgta	tgccggcgca	900
ggcggtggcg	gcgcgagccc	ggactacaac	agctccgagt	acgagggccc	gctcagcccc	960
ccgctctgtc	tcaatggcaa	cttctcactc	aagcaggact	cctcgcccga	ccacgagaaa	1020
agctaccact	actctatgca	ctactcggcg	ctgcccgggt	cgcggccccc	gggccaaggg	1080
ctagtcttcg	gctcgtcggc	tggtgcgggg	ggcgctccact	cggagaatct	cttgtcttac	1140
gatatgcacc	ttcaccacga	ccggggcccc	atgtaagagg	agctcaatgc	gttttttcat	1200
aactgagact	tcgcgcgcgc	tccctncttt	ttcttttgcc	tttgcccgcc	cccctgtccc	1260
cagccccccag	agcgacggga	cacccccatc	ctaccccggc	gcccggcgcg	gggagcgggc	1320
cacgggtctc	gccgctctcc	tggggcagcg	cagtcctgtt	acctgtgggt	ggcctgtccc	1380
aggggcctcg	cttccccccag	gggaactcgc	ttctctcccc	aaggggttcc	ctcctctctt	1440
ctcccaagga	gtgcttctcc	agggacctct	ctccgggggc	tccctggagg	cacccctccc	1500
ccattcccaa	tatcttcgct	gaggtttcct	ctcccccttc	ctccctgcag		1550

41

<210> 4  
 <211> 1635  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> gene  
 <222> (0)...(0)  
 <223> Achaete scute homologous protein (ASH1) gene;  
 Genbank accession L08424

<400> 4

cccgcagacc	ggcgcaagag	agcgagcct	tagtaggaga	ggaacgcgag	acgcggcaga	60
gcgcgttcag	cactgacttt	tgctgctgct	tctgcttttt	tttttcttag	aaacaagaag	120
gcgcagcg	cagcctcaca	cgcgagcgcc	acgcgaggct	cccgaagcca	acccgcgaag	180
ggaggagg	agggaggagg	aggcggcgtg	caggaggagg	aaaaagcatt	ttcacctttt	240
ttgctccac	tctaagaagt	ctcccgggga	ttttgtatat	attttttaac	ttccgtcagg	300
gtcccgcgtt	catatttcc	tttctttccc	tctctgttcc	tgaaccaag	ttctctctgt	360
gtcccgcgtg	cgggccccc	acctcgcgct	ccggatcgct	ctgattccgc	gactccttgg	420
ccgcgcgtgc	gcattggaag	ctctgccaa	atggagagcg	gcggcgccgg	ccagcagccc	480
cagccgcagc	cccagcagcc	cttctgccc	cccgcagcct	gtttctttgc	cacggcgcca	540
gccgcggcgg	ccgcagccgc	cgcagcgcca	gcgcagagcg	cgcagcagca	gcagcagcag	600
cagcagcagc	agcagcagca	gcaggcgccg	cagctgagac	cggcgcccca	cggccagccc	660
tcaggggggc	gtcacaagtc	agcgcccaag	caagtcaagc	gacagcgctc	gtcttcgccc	720
gaactgatgc	gctgcaaac	ccggctcaac	ttcagcggtc	ttggctacag	cctgccgcag	780
cagcagccgg	ccgcccgtgg	gcgcgcgaac	gagcgcgagc	gcaaccgcgt	caagttgggtc	840
aacctgggct	ttgccaccct	tcgggagcac	gtccccaacg	gcgcggccaa	caagaagatg	900
agtaagggtg	agacactgcg	ctcggcgggc	gagtacatcc	gcgcgctgca	gcagctgctg	960
gacgagcatg	acgcggtgag	cgccgccttc	caggcaggcg	tcctgtcgcc	caccatctcc	1020
cccaactact	ccaacgactt	gaactecatg	gccggctcgc	cgggtctcatc	ctactcgtcg	1080
gacgagggct	cttacgaccc	gctcagcccc	gaggagcagg	agcttctcga	cttcaccaac	1140
tggttctgag	gggctcggcc	tggtcaggcc	ctgggtgcga	tggaactttg	aagcagggtg	1200
atcgcaaac	ctgcattctt	agtgccttct	tgtcagtggtc	gttgggaggg	ggagaaaagg	1260
aaaagaaaa	aaaagaagaa	gaagaagaaa	agagaagaag	aaaaaacga	aaacagtcaa	1320
ccaaccccat	cgccaactaa	gcgaggcatg	cctgagagac	atggctttca	gaaaacggga	1380
agcgctcaga	acagtatctt	tgcactcaa	tcattcacgg	agatatgaag	agcaactggg	1440
acctgagtca	atgcgcaaaa	tgcagcttgt	gtgcaaaaag	agtgggctcc	tggcagaagg	1500
gagcagcaca	cgcgttatag	taactcccat	cacctctaac	acgcacagct	gaaagttctt	1560
gctcgggtcc	cttcacctcc	ccgccttttc	ttagagtgea	gttcttagcc	ctctagaaac	1620
gagttggtgt	ctttc					1635

<210> 5  
 <211> 3138  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> gene  
 <222> (0)...(0)  
 <223> Zic 1 Protein gene; Genbank Acession D76435

<400> 5

cggggtgcat	gcagctttct	ctaatttgc	ctcagttcct	ggctatgaat	tgetaaacta	60
tcagttctgc	gctcaccgcc	cggctgagga	ggtgaaagtt	tctcccagg	aagataaacc	120

42

gcaaaagaca	tatatgtgc	atgatttgcg	ccttttcttt	ggctttttct	ttctttcttc	180
acccccccac	ccactttttt	tttttttttt	ttcaaaaagc	agagagggaa	aaacggagag	240
tgaaggagcg	aggaggcgag	cgtgagagaa	aggagagaga	gagaaaaaga	agggcgaggg	300
gctagtggag	gaaggaaagga	ggggcgctg	cgcgagggcg	agagagggcg	aagcagtcgc	360
ggcactggcg	ctcacattcc	tctatgctac	aaatccagga	ggaagttttt	ttttaggggg	420
ctgagatgct	ccatgccttt	aaaaggcgag	ccttgacgcg	cggccctctc	ggcagagact	480
gagcggcgag	aaagtgcgag	cggggccggc	agaatctgcc	tggcgggcg	tggagcctgc	540
ggtactcgcg	gcccgcagcc	gtccggctac	tttgcgtttg	gcccggccag	cgccgcggcg	600
cgcgcgcgcg	ccattgcctg	caggctagga	cttcgcgagg	tgggtcgact	cacctctcct	660
cctcctcttc	ttcctcctct	tcctcctcct	cttgttcttc	ctcctcctcc	cgattttctc	720
tcctcggctg	gcgagggtgg	ggggggcggg	ggaggccggg	gctcgcctcg	agcagccacg	780
atgctcctgg	acgcgggccc	ccagtaccca	gcgatcgcg	tgaccacctt	tggcgcgctc	840
cgcaccact	cgcggggcga	cgtggccgaa	cgagacgtgg	gcctgggcat	caaccggttc	900
gcgacggcga	tgggcgcctt	caagctcaac	cccagttcgc	acgagctggc	ttcggccggc	960
cagacagcct	tcacgtcgca	ggcgccaggc	tacgcggctg	ctgcggccct	gggccatcac	1020
catcacccgg	gccacgtcgg	ctcctatttc	agcgcagcct	tcaactccac	gcgggacttt	1080
ctgttcgcga	accgggggtt	tggcgacgcg	gcggcgccag	ccagcgcaca	gcacagcctc	1140
tttgctgcgt	cggccggggg	cttcgggggc	ccacacggcc	acacggacgc	cgcggggcac	1200
cctcctcttc	cggggcttca	cgcgcagcct	gcccggccacg	cgtcgcctaa	cgtgggtcac	1260
gggcagatga	ggctcggctt	ctcgggggac	atgtaccgcg	gaccggagca	gtacggccag	1320
gtgaccagcc	cgcgttcgga	gcactatgct	gcgcgcgagc	tgacaggcta	cgggcccctg	1380
aacgtgaaca	tggccgcgca	tcacggcgcc	ggcgccctct	tcgcctacat	gcgcacaacc	1440
atcaagcaag	agctcatctg	caagtggatc	gagcccgagc	agctggccaa	ccccaaaag	1500
tcgtgcaaca	aaactttcag	cacctatgac	gagctagtta	cgcacgtcac	cgtggagcac	1560
gtaggtggcc	cggagcagag	taatcacatc	tgcttctggg	aggagtgtcc	gcgcgagggc	1620
aagcccttca	aagccaaata	caaaactggt	aaccacatcc	gcgtgcacac	gggcgagaag	1680
ccctttccct	gccccctccc	tggctgtggc	aaggctctcg	cgcgtccga	gaatttaaag	1740
atccacaaaa	ggacgcacac	aggggagaag	cccttcaagt	gcgagtttga	gggctgtgac	1800
cggcgcttcg	ctaacagcag	cgcacgcaag	aagcacatgc	acgtgcacac	gagcgacaag	1860
ccctatcttt	gcaagatgtg	cgacaagtec	tacacgcata	ccagttccgt	gcgcaaacac	1920
atgaaggctc	acgaatcctc	ctcgcagggc	tcgcagcctt	cgcgcggccg	cagctctggc	1980
tacgaatcct	ccacgcctcc	cacctcgtg	tctccctcca	cagacaaccc	gaccacaagc	2040
tccttatcgc	cctcctcctc	cgcagtcac	cacacagccg	gccacagtgc	gctctcttcc	2100
aatttttaacg	aatggtagct	ttaaaatcag	aaacaaaaca	tcgaacaaaa	ccctatttaa	2160
gagacttgat	cacacacgta	tacacaacat	tactgaaaga	accctgcgaa	tcacaaacac	2220
ccccacacag	accccgcaat	cctcttttaa	aaaatctgcc	aatagaccca	ggacgagtaa	2280
gagaggaagc	atcaaccttt	taaaaatttc	ctttcgcttt	cattattttt	cttttttttg	2340
caaaggccttg	gtacccaagg	tgcggtaggg	ggtcgagggg	gaggaggcca	cctgacaaaa	2400
tgcgcgcaac	cccgagggcc	agtttcttgt	cgaattggta	cgggctctct	ggggcttcgg	2460
cttctttttt	tctttgtttt	cttgtaaata	cagaattatt	agcttaaaac	tgtactgttg	2520
aattctgtaa	atagttatat	ctcggttgga	gcgggtgggt	gggattgtgg	cgttgtgggc	2580
tttgcatctg	gggagggggg	agggaccgga	tgggcggggg	gagggggagg	gggaggggtg	2640
ggcggccgaa	agccaactgt	ttgtactgaa	tggcaagaat	gttctagtaa	atgtgtacca	2700
aaatgtgaat	tactttgtac	gattacagtc	tcacgctcga	cctaaccsaa	tattattggg	2760
attaatgtgc	tttttttgta	taaagtgcga	acatttcgtc	ccaaagtcta	agtactttag	2820
tgcagtaaaa	tgttgtttca	tgtcctgtca	agaattcgta	tagtacgagc	ctggatctgc	2880
gtgtcaaaact	gttccatttg	tttatgtaaa	gtgatattaa	aaaagatata	aactataact	2940
gtccgttact	tttggcaaaa	gatacaacca	cataatgtat	ataattccta	gtttccatat	3000
ttatccgcat	gtaaagggcc	ggtttatcca	tgttacagct	cttcaatatt	tatggctaga	3060
agaactcgta	tgtacacttt	agtttccaga	actgtttggg	aacctttcgt	accttattaa	3120
agattcttaa	atctcaaa					3180

<210> 6

<211> 2623



<212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> gene  
 <222> (0)...(0)  
 <223> Myelin transcription factor 1 (MyT1) gene Genbank  
 Accession M96980

```

<400> 6
cggaagagtt actacagtaa agatccttca agagctgaga agcgtgagat caagtgtcca      60
acaccaggct gtgatggcac tggccacggt accgggttgt accctcacca ccgcagcett      120
tctggctgtc cccacaagga taggatcccc ccagagatct tagccatgca tggagaacgtg      180
ctgaagtgcc ccactcctgg ctgcacaggc cagggtcacg tgaacagcaa ccgcaaacag      240
cacagaagtt tgtctgggtg tcccattgct gccgccgaaa aattagccaa atcccatgag      300
aagcagcagc cgcagacagg agatccttcc aagagtagct ccaattccga tcggatcctc      360
aggccccatgt gcttcgtgaa gcagctcgag gtccctccat atgggagcta ccggcccaac      420
gtggccccc cccacaccca gggccaaact ggcaaggagc tggagaagtt ctccaaggte      480
acctttgact acgcaagttt ogatgctcag gtttttgga aacgcatgct tgccccaaag      540
attcagacca gcgaacacct acctaaagcc ttccaatcca aacctttccc aaaggcctct      600
tccccaggc acagccctc cagtagttat gtgaggagca cttcatcctc ttctgcagge      660
tttgactact cgcaggacgc cgaggctgca cacatggctg cacttgccat cctgaacctc      720
tccacgcgct gctgggagat gcctgagaac ctacgacga agccacagga cctccccagc      780
aagtctgtgg atatcgaggt agacgaaaat ggaaccctgg acttgagcat gcacaaacac      840
cgcaaacgag aaaatgcttt cccagcagc agcagctgca gcagcagccc cgggtgtgaag      900
tctcccgacg cctcccgagc ccacagcagc accagcgcgc ccagcagctc catgacctct      960
ccccagttcca gccaggcctc ccgccaggac gagggtggacc ggccccctgga ctacaccaag      1020
cctagccgcc tgagagagga ggaacctgag gagtcaagac cagcagccca ttcttttgt      1080
tcttctgaag cagatgacca ggaagtgtcg gaagagaatt ttgaggagcg gaagtatccg      1140
ggggaagtca ccctgaccaa ctttaagctg aagttttctc ccaaggacat aaagaaggag      1200
ctgtctacct gtcccacccc tggctgtgac ggcagcggcc acatcaccgg gaactacgcc      1260
tcccaccgca gcctctctgg ttgcctctt gctgacaaga gcctcagaaa cctcatgggt      1320
accactctg ctgacctgaa gtgcccacg cccggctgtg acggctctgg ccacatcaca      1380
gggaactacg cttcacaccg gagcttgtcc ggctgcccctc gtgcaaagaa aagtggagtc      1440
aaggtggcac ccaccaagga cgacaaggag gaccccgagc tgatgaagtg cccagttcca      1500
ggctgtgtgg ggctcggtca catcagcggg aaatacgcct ctacacaggag cgcacccggc      1560
tgcccactgg ccgcccgcag gcagaaggaa gggctccctc atggctcgtc attctcctgg      1620
aagtccctga agaatagaaga cccgacctgc cccaccccg gctgtgacgg ctctggccac      1680
accattggga gtttctctac ccaccggagt ttgtcaggct gtcccagagc aacctttgct      1740
ggaaagaagg gaaaactgtc aggggatgag gtccctcagtc caaagttcaa gactagcgac      1800
gtgttgagga atgatgagga gatcaagcag ctgaaccagg agatccgaga cctgaacgag      1860
tccaactcgg agatggaggc tgccatggtg cagctgcagt cccagatctc ctccatggag      1920
aagaacctga agaacatcga ggaggagaac aagctcattg agggagcagaa tgaagccctg      1980
tttctggagc tgtccggcct gagccaggcc ctcatccaaa gtctcgccaa tatccacctt      2040
ccacacatgg agccaatatg cgaacagaat ttctgtccct atgtgagcac cctcaccgac      2100
atgtactcca accaggcccc ggagaacaag gacctcctgg agagcatcaa gcaggctgtg      2160
aggggcatcc aggtctaggc cgtgtggtac ccagaagtgt cccagcccac cacaccgttt      2220
acctccctcg cctgcccccg caccgtgggg atgcccact cacagtgaact tcccgtttgg      2280
ggccccgtgt ggccgaggcg ggtttatcca aagggatggc tggaaattgg ccgctcccac      2340
gaggetcect ccaggcttgg ccgtggtggc cctatctgtg tgcatagggg cactgaagaa      2400
ttacaaaagt atttattttt gttttctgaa agaaatctga agagcagctc aaagtctcca      2460
gtggaagctc atggacaagg ttctcaggga agttttggag ttgcaacca cagtattcct      2520
ttgtctgtcg aggctgggag gtagccgtg agcgtggtgg gtgggtggtg tgagtggcat      2580
cttggcctgg agtacacgcc tggggcagcg tgtctgtgct cag      2623

```

44

<210> 7  
 <211> 356  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (0)...(0)  
 <223> Neuro D1 protein; Genbank Accession D82347

<400> 7  
 Met Thr Lys Ser Tyr Ser Glu Ser Gly Leu Met Gly Glu Pro Gln Pro  
 1 5 10 15  
 Gln Gly Pro Pro Ser Trp Thr Asp Glu Cys Leu Ser Ser Gln Asp Glu  
 20 25 30  
 Glu His Glu Ala Asp Lys Lys Glu Asp Asp Leu Glu Ala Met Asn Ala  
 35 40 45  
 Glu Glu Asp Ser Leu Arg Asn Gly Gly Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu  
 50 55 60  
 Asp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Gln Lys  
 65 70 75 80  
 Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala Arg Leu  
 85 90 95  
 Glu Arg Phe Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Asn Ala Arg Glu Arg Asn  
 100 105 110  
 Arg Met His Gly Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu Arg Lys Val Val  
 115 120 125  
 Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr Leu Arg  
 130 135 140  
 Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile Leu Arg Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Ser Pro Asp Leu Val Ser Phe Val Gln Thr Leu Cys Lys Gly Leu  
 165 170 175  
 Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Gly Gly Cys Leu Gln Leu Asn Pro  
 180 185 190  
 Arg Thr Phe Leu Pro Glu Gln Asn Gln Asp Met Pro Pro His Leu Pro  
 195 200 205  
 Thr Ala Ser Ala Ser Phe Pro Val His Pro Tyr Ser Tyr Gln Ser Pro  
 210 215 220  
 Gly Leu Pro Ser Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asp Ser Ser His Val Phe  
 225 230 235 240  
 His Val Lys Pro Pro Pro His Ala Tyr Ser Ala Ala Leu Glu Pro Phe  
 245 250 255  
 Phe Glu Ser Pro Leu Thr Asp Cys Thr Ser Pro Ser Phe Asp Gly Pro  
 260 265 270  
 Leu Ser Pro Pro Leu Ser Ile Asn Gly Asn Phe Ser Phe Lys His Glu  
 275 280 285  
 Pro Ser Ala Glu Phe Glu Lys Asn Tyr Ala Phe Thr Met His Tyr Pro  
 290 295 300  
 Ala Ala Thr Leu Ala Gly Ala Gln Ser His Gly Ser Ile Phe Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Thr Ala Ala Pro Arg Cys Glu Ile Pro Ile Asp Asn Ile Met Ser Phe  
 325 330 335  
 Asp Ser His Ser His His Glu Arg Val Met Ser Ala Gln Leu Asn Ala

45

Ile Phe His Asp  
355

345

350

<210> 8  
<211> 356  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> PEPTIDE  
<222> (0)...(0)  
<223> Neurogenic basic helix-loop-helix protein (Neurod  
1); Genbank Accession U50822.

<400> 8  
Met Thr Lys Ser Tyr Ser Glu Ser Gly Leu Met Gly Glu Pro Gln Pro  
1 5 10 15  
Gln Gly Pro Pro Ser Trp Thr Asp Glu Cys Leu Ser Ser Gln Asp Glu  
20 25 30  
Glu His Glu Ala Asp Lys Lys Glu Asp Asp Leu Glu Ala Met Asn Ala  
35 40 45  
Glu Glu Asp Ser Leu Arg Asn Gly Gly Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu  
50 55 60  
Asp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Gln Lys  
65 70 75 80  
Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala Arg Leu  
85 90 95  
Glu Arg Phe Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Asn Ala Arg Glu Arg Asn  
100 105 110  
Arg Met His Gly Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu Arg Lys Val Val  
115 120 125  
Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr Leu Arg  
130 135 140  
Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile Ser Arg Ser Gly  
145 150 155 160  
Lys Ser Pro Asp Leu Val Ser Phe Val Gln Thr Leu Cys Lys Gly Leu  
165 170 175  
Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu Gln Leu Asn Pro  
180 185 190  
Arg Thr Phe Leu Pro Glu Gln Asn Gln Asp Met Pro Pro His Leu Pro  
195 200 205  
Thr Ala Ser Ala Ser Phe Pro Val His Pro Tyr Ser Tyr Gln Ser Pro  
210 215 220  
Gly Leu Pro Ser Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asp Ser Ser His Val Phe  
225 230 235 240  
His Val Lys Pro Pro Pro His Ala Tyr Ser Ala Ala Leu Glu Pro Phe  
245 250 255  
Phe Glu Ser Pro Leu Thr Asp Cys Thr Ser Pro Ser Phe Asp Gly Pro  
260 265 270  
Leu Ser Pro Pro Leu Ser Ile Asn Gly Asn Phe Ser Phe Lys His Glu  
275 280 285  
Pro Ser Ala Glu Phe Glu Lys Asn Tyr Ala Phe Thr Met His Tyr Pro  
290 295 300

46

Ala Ala Thr Leu Ala Gly Ala Gln Ser His Gly Ser Ile Phe Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Thr Ala Ala Pro Arg Cys Glu Ile Pro Ile Asp Asn Ile Met Ser Phe  
 325 330 335  
 Asp Ser His Ser His His Glu Arg Val Met Ser Ala Gln Leu Asn Ala  
 340 345 350  
 Ile Phe His Asp  
 355

<210> 9  
 <211> 382  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (0)...(0)  
 <223> Neurogenic basic helix-loop-helix protein (neuro  
 D2); Genbank Accession U58681.

<400> 9  
 Met Leu Thr Arg Leu Phe Ser Glu Pro Gly Leu Leu Ser Asp Val Pro  
 1 5 10 15  
 Lys Phe Ala Ser Trp Gly Asp Gly Glu Asp Asp Glu Pro Arg Ser Asp  
 20 25 30  
 Lys Gly Asp Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala Pro Gly Pro Gly Ala  
 35 40 45  
 Pro Gly Pro Ala Arg Ala Ala Lys Pro Val Pro Leu Arg Gly Glu Glu  
 50 55 60  
 Gly Thr Glu Ala Thr Leu Ala Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu Leu Gly  
 65 70 75 80  
 Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Leu Asp Glu Ala  
 85 90 95  
 Glu Gly Glu Arg Pro Lys Lys Arg Gly Pro Lys Lys Arg Lys Met Thr  
 100 105 110  
 Lys Ala Arg Leu Glu Arg Ser Lys Leu Arg Arg Gln Lys Ala Asn Ala  
 115 120 125  
 Arg Glu Arg Asn Arg Met His Asp Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu  
 130 135 140  
 Arg Lys Val Val Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile  
 145 150 155 160  
 Glu Thr Leu Arg Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile  
 165 170 175  
 Leu Arg Ser Gly Lys Arg Pro Asp Leu Val Ser Tyr Val Gln Thr Leu  
 180 185 190  
 Cys Lys Gly Leu Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu  
 195 200 205  
 Gln Leu Asn Ser Arg Asn Phe Leu Thr Glu Gln Gly Ala Asp Gly Ala  
 210 215 220  
 Gly Arg Phe His Gly Ser Gly Gly Pro Phe Ala Met His Pro Tyr Pro  
 225 230 235 240  
 Tyr Pro Cys Ser Arg Leu Ala Gly Ala Gln Cys Gln Ala Ala Gly Gly  
 245 250 255  
 Leu Gly Gly Gly Ala Ala His Ala Leu Arg Thr His Gly Tyr Cys Ala

47



Ser Pro Val Ser Ser Tyr Ser Ser Asp Glu Gly Ser Tyr Asp Pro Leu  
 210 215 220  
 Ser Pro Glu Glu Gln Glu Leu Leu Asp Phe Thr Asn Trp Phe  
 225 230 235

<210> 11  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (0)...(0)  
 <223> Zic 1 protein; Genbank Accession D76435.

<400> 11  
 Met Leu Leu Asp Ala Gly Pro Gln Tyr Pro Ala Ile Gly Val Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Phe Gly Ala Ser Arg His His Ser Ala Gly Asp Val Ala Glu Arg Asp  
 20 25 30  
 Val Gly Leu Gly Ile Asn Pro Phe Ala Asp Gly Met Gly Ala Phe Lys  
 35 40 45  
 Leu Asn Pro Ser Ser His Glu Leu Ala Ser Ala Gly Gln Thr Ala Phe  
 50 55 60  
 Thr Ser Gln Ala Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Ala Leu Gly His His  
 65 70 75 80  
 His His Pro Gly His Val Gly Ser Tyr Ser Ser Ala Ala Phe Asn Ser  
 85 90 95  
 Thr Arg Asp Phe Leu Phe Arg Asn Arg Gly Phe Gly Asp Ala Ala Ala  
 100 105 110  
 Ala Ala Ser Ala Gln His Ser Leu Phe Ala Ala Ser Ala Gly Gly Phe  
 115 120 125  
 Gly Gly Pro His Gly His Thr Asp Ala Ala Gly His Leu Leu Phe Pro  
 130 135 140  
 Gly Leu His Glu Gln Ala Ala Gly His Ala Ser Pro Asn Val Val Asn  
 145 150 155 160  
 Gly Gln Met Arg Leu Gly Phe Ser Gly Asp Met Tyr Pro Arg Pro Glu  
 165 170 175  
 Gln Tyr Gly Gln Val Thr Ser Pro Arg Ser Glu His Tyr Ala Ala Pro  
 180 185 190  
 Gln Leu His Gly Tyr Gly Pro Met Asn Val Asn Met Ala Ala His His  
 195 200 205  
 Gly Ala Gly Ala Phe Phe Arg Tyr Met Arg Gln Pro Ile Lys Gln Glu  
 210 215 220  
 Leu Ile Cys Lys Trp Ile Glu Pro Glu Gln Leu Ala Asn Pro Lys Lys  
 225 230 235 240  
 Ser Cys Asn Lys Thr Phe Ser Thr Met His Glu Leu Val Thr His Val  
 245 250 255  
 Thr Val Glu His Val Gly Gly Pro Glu Gln Ser Asn His Ile Cys Phe  
 260 265 270  
 Trp Glu Glu Cys Pro Arg Glu Gly Lys Pro Phe Lys Ala Lys Tyr Lys  
 275 280 285  
 Leu Val Asn His Ile Arg Val His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Pro Cys  
 290 295 300

49

Pro Phe Pro Gly Cys Gly Lys Val Phe Ala Arg Ser Glu Asn Leu Lys  
 305 310 315 320  
 Ile His Lys Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Glu Phe  
 325 330 335  
 Glu Gly Cys Asp Arg Arg Phe Ala Asn Ser Ser Asp Arg Lys Lys His  
 340 345 350  
 Met His Val His Thr Ser Asp Lys Pro Tyr Leu Cys Lys Met Cys Asp  
 355 360 365  
 Lys Ser Tyr Thr His Pro Ser Ser Val Arg Lys His Met Lys Val His  
 370 375 380  
 Glu Ser Ser Ser Gln Gly Ser Gln Pro Ser Pro Ala Ala Ser Ser Gly  
 385 390 395 400  
 Tyr Glu Ser Ser Thr Pro Pro Thr Ile Val Ser Pro Ser Thr Asp Asn  
 405 410 415  
 Pro Thr Thr Ser Ser Leu Ser Pro Ser Ser Ser Ala Val His His Thr  
 420 425 430  
 Ala Gly His Ser Ala Leu Ser Ser Asn Phe Asn Glu Trp Tyr Val  
 435 440 445

<210> 12  
 <211> 725  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> PEPTIDE  
 <222> (0)...(0)  
 <223> Myelin transcription factor 1 (My T1); Genbank  
 Accession M96980.

<400> 12  
 Arg Lys Ser Tyr Tyr Ser Lys Asp Pro Ser Arg Ala Glu Lys Arg Glu  
 1 5 10 15  
 Ile Lys Cys Pro Thr Pro Gly Cys Asp Gly Thr Gly His Val Thr Gly  
 20 25 30  
 Leu Tyr Pro His His Arg Ser Leu Ser Gly Cys Pro His Lys Asp Arg  
 35 40 45  
 Ile Pro Pro Glu Ile Leu Ala Met His Glu Asn Val Leu Lys Cys Pro  
 50 55 60  
 Thr Pro Gly Cys Thr Gly Gln Gly His Val Asn Ser Asn Arg Asn Thr  
 65 70 75 80  
 His Arg Ser Leu Ser Gly Cys Pro Ile Ala Ala Glu Lys Leu Ala  
 85 90 95  
 Lys Ser His Glu Lys Gln Gln Pro Gln Thr Gly Asp Pro Ser Lys Ser  
 100 105 110  
 Ser Ser Asn Ser Asp Arg Ile Leu Arg Pro Met Cys Phe Val Lys Gln  
 115 120 125  
 Leu Glu Val Pro Pro Tyr Gly Ser Tyr Arg Pro Asn Val Ala Pro Arg  
 130 135 140  
 His Thr Gln Gly Gln Leu Gly Lys Glu Leu Glu Lys Phe Ser Lys Val  
 145 150 155 160  
 Thr Phe Asp Tyr Ala Ser Phe Asp Ala Gln Val Phe Gly Lys Arg Met  
 165 170 175  
 Leu Ala Pro Lys Ile Gln Thr Ser Glu Thr Ser Pro Lys Ala Phe Gln

50





610                      615                      620  
 Met Glu Ala Ala Met Val Gln Leu Gln Ser Gln Ile Ser Ser Met Glu  
 625                      630                      635                      640  
 Lys Asn Leu Lys Asn Ile Glu Glu Glu Asn Lys Leu Ile Glu Glu Gln  
                     645                      650                      655  
 Asn Glu Ala Leu Phe Leu Glu Leu Ser Gly Leu Ser Gln Ala Leu Ile  
                     660                      665                      670  
 Gln Ser Leu Ala Asn Ile His Leu Pro His Met Glu Pro Ile Cys Glu  
                     675                      680                      685  
 Gln Asn Phe Val Pro Tyr Val Ser Thr Leu Thr Asp Met Tyr Ser Asn  
                     690                      695                      700  
 Gln Ala Pro Glu Asn Lys Asp Leu Leu Glu Ser Ile Lys Gln Ala Val  
 705                      710                      715                      720  
 Arg Gly Ile Gln Val  
                     725

<210> 13  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> gene  
 <222> (0)...(0)  
 <223> MSX1 antisense oligonucleotide sequence MSX1-1

<400> 13  
 gacacccgagt ggcaaagaag tcatgtc

27

<210> 14  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> gene  
 <222> (0)...(0)  
 <223> MSX1 antisense oligonucleotide sequence MSX1-2

<400> 14  
 cggcttcctg tggtcggcca tgag

24

<210> 15  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> gene  
 <222> (0)...(0)  
 <223> HES1 open reading frame 5' sequence (HES1-1)

<400> 15  
 accgggggacg aggaattttt ctccattata tcagc

35

52

<210> 16  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> gene  
<222> (0)...(0)  
<223> HES1 open reading frame middle sequence (HES1-2)

<400> 16  
cacggagggtg ccgtgtgtgc tgggctggtg tgggtgtagac

40

53

cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of said cells. An effect altering cell survival, a morphological or electrophysiological characteristic and/or a molecular biological property of the cells indicates the activity of the chemotherapeutic agent.

5       The present invention is also related to a kit for transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell. The kit is useful for practicing the inventive methods.

10       The present invention is directed to methods of converting, or transdifferentiating, epidermal cells into different types of neural cells having numerous uses in the field of applied neurobiology. In particular, the newly created neurons of the invention can be used in both cell therapies and gene therapies aimed at alleviating neurological disorders and diseases. Further, the invention obviates the need for human fetal tissue as a renewable source of neurons to be used in various medical and research applications.

15       These and other advantages and features of the present invention will be described more fully in a detailed description of the preferred embodiments which follows.

#### 4 Brief Description of Drawings

##### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Transdifferentiation of epidermal basal cells into neuronal cells. Dedifferentiated epidermal basal cells were transfected with NeuroD1+Zic1+MyT1 and simultaneously treated with antisense oligonucleotides corresponding to a portion of MSX1 and HES transcription factors. (A) epidermal basal cells, (B) dedifferentiated epidermal basal cells, (C) newly created neurons, 25% of cells are Neurofilament M immunoreactive 5 days after transfection and treatment with BDNF and all-trans retinoic acid.

##### DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION

25       An awareness of the difficulties currently associated with neuronal cell or gene therapy approaches, as these pertain to the use of alternative sources of neuronal cells, especially those used for autologous transplantation, has led to the present invention. The present invention provides methods to convert, or transdifferentiate, epidermal cells into different types of neuronal cells that can be used for intracerebral transplantation. Importantly, the present

## 2 Claims

### CLAIMS

1. A method of transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell, comprising:
- 5 (a) culturing a proliferating epidermal basal cell population comprising one or more epidermal basal cell(s), said cell(s) derived from the skin of a mammalian subject;
- (b) transfecting said epidermal basal cell, in vitro, with one or more eukaryotic expression vector(s) containing at least one cDNA encoding a human neurogenic transcription factor, or homologous non-human counterpart, or active fragment(s) thereof, from the group consisting of
- 10 NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, and MyT1, such that at least one of the neurogenic transcription factor(s) is expressed in said cell;
- (c) growing the transfected cell in the presence of at least one antisense oligonucleotide comprising a segment of a human MSX1 gene and/or human HES1 gene, or homologous non-human counterpart of either of these, thereby suppressing at least one negative regulator of neuronal
- 15 differentiation; and, optionally,
- (d) growing said epidermal cell with a retinoid and at least one neurotrophin selected from the group consisting of BDNF, CNTF, PDGF, NGF, NT-3, NT-4, sonic hedgehog, and active fragments of any of these, or a cytokine comprising IL-6, whereby the cell is transdifferentiated into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural
- 20 progenitor, neuronal, or glial cell.
2. The method of Claim 1, wherein the physiological and/or immunological feature is expression of a marker selected from the group consisting of nestin, neural RNA-binding protein Musashi, neurofilament M, neural-specific  $\beta$ -tubulin, neural-specific enolase, microtubule associated protein 2, glial fibrillary acidic protein (GFAP), O4, or a combination of any of these.
- 25 3. The method of Claim 1, wherein the morphological feature comprises one or more morphological neurite-like process(es) at least about 50 micrometers in length.
4. A transdifferentiated cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell, comprising:
- an epidermal basal cell transfected with one or more expression vectors comprising a constitutive
- 30 eukaryotic promoter sequence operatively linked to a DNA(s) encoding the neurogenic transcription

55

factor NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, or MyT1, wherein the DNA encoding the neurogenic transcription factor is of human origin, or is a non-human homologous counterpart, or is an active fragment of a gene encoding any of these, said cell being treated with at least one antisense oligonucleotide comprising a segment(s) of human MSX1 gene or human HES1 gene, or non-human homologous counterpart thereof, and wherein said cell was grown in the presence of a retinoid and at least one neurotrophin, thereby transdifferentiating said epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell.

5           5.       The transdifferentiated cell of Claim 4, wherein the physiological and/or immunological feature is expression of a marker selected from the group consisting of nestin, neural RNA-binding protein Musashi, neurofilament M, neural-specific  $\beta$ -tubulin, neural-specific enolase, microtubule associated protein 2, glial fibrillary acidic protein (GFAP), O4, or a combination of any of these.

6.       The transdifferentiated cell of Claim 4, wherein the morphological feature comprises one or more morphological neurite-like process(es) at least about 50 micrometers in length.

15       7.       The transdifferentiated cell of Claim 4, wherein the physiological and/or immunological feature expressed by the cell is a marker selected from the group consisting of nestin, neural RNA-binding protein Musashi, neurofilament M, neural-specific  $\beta$ -tubulin, neural-specific enolase, microtubule associated protein 2, glial fibrillary acidic protein (GFAP), O4, or a combination of any of these.

20       8.       The transdifferentiated cell of Claim 4, wherein the morphological feature expressed by the cell is one or more morphological neurite-like process(es) at least about 50 micrometers in length.

9.       A cell culture derived from the transdifferentiated cell of Claim 4, comprising a plurality of cells that express one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell.

25       10.      A kit for converting epidermal basal cells to cells into cells having one or more

56

morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell, said kit comprising:

(A) one or more eukaryotic expression vector(s) containing cDNA encoding a neurogenic transcription factor, or fragment thereof, from the group consisting of NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, and MyT1, or a non-human homologous counterpart of any of these;

(B) at least one antisense oligonucleotide corresponding to the human MSX1 gene, the human HES1 gene, or a non-human homologous counterpart of either of these; and

(C) a retinoid and at least one neurotrophin from the group consisting of BDNF, CNTF, PDGF, NGF, NT-3, NT-4, and sonic hedgehog.

10

11. The kit of Claim 10, further comprising instructions for using (A), (B), and (C) in transdifferentiating a mammalian subject's epidermal basal cell(s).

12. A method of using transdifferentiated epidermal basal cells having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell to isolate a novel nerve growth factor, comprising:

(a) transdifferentiating epidermal basal cells to cells having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell as in Claim 1;

(b) culturing the transdifferentiated cells in vitro;

(c) exposing the cultured cells, in vitro, to a potential nerve growth factor; and

(d) detecting the presence or absence of an effect of the potential nerve growth factor on the survival of the cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of said cells, whereby an effect altering cell survival, an electrophysiological characteristic and/or a molecular biological property in the cells indicates the action of the novel nerve growth factor.

13. A method of using transdifferentiated epidermal basal cells having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell to screen a potential new drug for treating a nervous system disorder, comprising:

(a) transdifferentiating epidermal basal cells from a patient with a nervous system disorder

57

to cells having one or more morphological, physiological and/or immunological feature(s) of a neural progenitor, neuronal, or glial cell as in Claim 1;

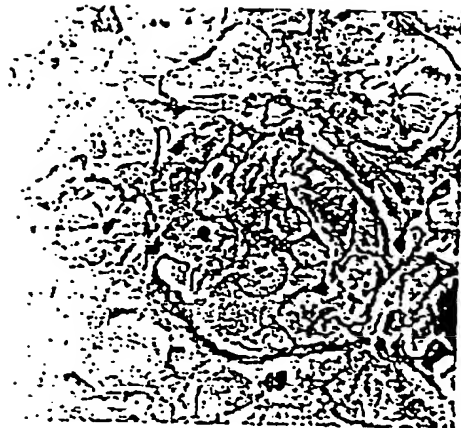
(b) culturing the transdifferentiated cells in vitro;

(c) exposing the cultured cells, in vitro, to a potential new drug; and

5 (d) detecting the presence or absence of an effect of the potential new drug on the survival of the cells or on a morphological or electrophysiological characteristic and/or molecular biological property of said cells, whereby an effect altering cell survival, an electrophysiological characteristic and/or a molecular biological property in the cells indicates the action of the potential new drug factor.

10 14. The method of Claim 1, wherein culturing a proliferating epidermal basal cell population comprising one or more epidermal basal cell(s) comprises separating basal cells from keratinocytes using a calcium-free medium.

A



B



C



Figure 1.



1 Abstract

ABSTRACT OF THE DISCLOSURES

Disclosed is a method of transdifferentiating an epidermal basal cell into a cell having one or more morphological, physiological and/or immunological features of a neural progenitor, neuronal, or glial cell by culturing a proliferating epidermal basal cell population derived  
5 from the skin of a mammalian subject; transfecting the cells, in vitro, with one or more eukaryotic expression vector(s) that contain at least one cDNA encoding a human neurogenic transcription factor, or homologous non-human counterpart, or active fragment(s) thereof, such as NeuroD1, NeuroD2, ASH1, Zic1, Zic3, or MyT1, such that at least one of the neurogenic transcription factor(s) is expressed in the cell; growing the cells in an in vitro  
10 growth medium in which is present at least one antisense oligonucleotide comprising a segment of a human MSX1 gene and/or human HES1 gene, or homologous non-human counterpart of either of these, thereby suppressing at least one negative regulator of neuronal differentiation; and the cell(s) are, optionally, further grown with a retinoid and at least one neurotrophin, such as BDNF, CNTF, PDGF, NGF, NT-3, NT-4, or sonic hedgehog, or a  
15 cytokine comprising IL-6. Also disclosed is a transdifferentiated cell of epidermal origin and cell cultures derived therefrom. In addition, methods of using the inventive transdifferentiated cell(s) and cell cultures to identify a novel nerve growth factor or to screen a potential chemotherapeutic agent by detecting the presence or absence of an effect, in vitro, on a morphological, physiological and/or molecular biological property of the  
20 transdifferentiated cell(s) are described, as is a method of using the transdifferentiated cell(s) and cell cultures to screen a potential chemotherapeutic agent to treat a nervous system disorder of genetic origin. A kit useful for practicing the methods is disclosed.

13922.1

2 Representative Drawing

None